

EPIDEMIOLOGIA ED EVOLUZIONE DI PCV-2: UN VECCHIO, NUOVO VIRUS

EPIDEMIOLOGY AND EVOLUTION OF PCV-2: AN OLD, NEW VIRUS

FRANZO GIOVANNI

*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di
Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro (PD), 35020, Italia*

Parole chiave: PCV-2; Epidemiologia; Evoluzione

Keywords: PCV-2; Epidemiology; Evolution

RIASSUNTO

L'identificazione di Porcine circovirus 2 (PCV-2) risale ormai a diversi decenni fa e molti studi ne hanno dimostrato un'origine ben più antica. Nonostante ciò, l'aggettivo "emergente" è tuttora spesso associato a questo patogeno, non del tutto a torto. In virtù del suo elevato potenziale evolutivo, PCV-2 ha saputo "rinnovarsi" nel corso del tempo, ponendo sempre nuove sfide nella conoscenza della sua biologia ed epidemiologia, e quindi nel suo controllo. Il presente elaborato mira a riassumere brevemente le attuali conoscenze sulla variabilità virale e i determinanti che ne sono alla base. Caratteristiche proprie del virus e dei moderni sistemi di allevamento intensivo hanno infatti favorito negli anni l'alternarsi di diversi genotipi con caratteristiche biologiche in parte diverse. Questo, oltre a complicare la classificazione di PCV-2 e lo studio della sua epidemiologia, ha posto e continua a porre nuovi interrogativi sull'efficacia delle strategie di controllo, vaccinazione *in primis*. Sebbene i dati a nostra disposizione depongano a favore di una sostanziale protezione clinica indotta dai vaccini in uso, quando correttamente applicati, il quadro complessivo è probabilmente ben più complesso. Le grandi, dense e interconnesse popolazioni animali tipiche dell'allevamento intensivo possono sostenere parimenti enormi popolazioni virali sulle quali, in presenza di un'immunità non sterilizzante, le spinte evolutive indotte dall'immunità naturale e potenzialmente dalla stessa immunità vaccinale possono agire determinando un quadro in continuo divenire. A ciò si associa la presenza di diverse nicchie ecologiche scarsamente o per nulla studiate, che potrebbero albergare nuove varianti o favorirne l'evoluzione in direzioni non prevedibili. Si rende quindi necessario un continuo e più approfondito studio dell'epidemiologia di PCV-2, nonché lo sviluppo di strumenti di controllo sempre più efficaci e cross-protettivi, in grado di limitare non solo la comparsa di segni clinici ma la replicazione virale stessa, frenando così la corsa evolutiva di questo virus.

ABSTRACT

Porcine circovirus 2 (PCV-2) was identified several decades ago and different studies have revealed a far more ancient origin. Nevertheless, PCV-2 is still considered an "emerging" pathogen from various perspectives. Thanks to its remarkable evolutionary potential, PCV-2 was able to evolve over time, posing new challenges to the knowledge of its biology, epidemiology and thus to its control. The present work aims to briefly summarize the state of the art on PCV-2 heterogeneity and its determinants. Viral features and peculiarities of modern intensive pig farming have favoured the emergence of a number of genotypes with partially different characteristics. Besides complicating the PCV-2 classification and the

study of its epidemiology, such variability has risen questions on the efficacy of available control strategies, especially vaccination. Although current data support a substantial clinical protection conferred by available vaccines, at least when properly applied, the overall situation is likely much more complex. The huge, dense, and interconnected animal populations featuring intensive farming can maintain similarly big viral populations on which, because of the non-sterilizing immunity, selective forces caused by natural and likely vaccine-induced immunity can lead to a dynamic and ever-changing scenario. The presence of ecological niches that are poorly or not investigated and that might host new genetic variants or unpredictably enhance their evolution is a further menace for swine farming. The continuous and extensive monitoring of PCV-2 molecular epidemiology is, therefore, mandatory. Similarly pivotal will be the development of updated control measures, with a broader cross-protection and efficacy, devoted to the control not only of the clinical signs and productivity losses but of the viral replication also, thus slowing down the evolutionary race of this virus.

INTRODUZIONE

Gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da un'enorme espansione nella conoscenza della diversità virale grazie allo sviluppo di metodiche diagnostiche e di caratterizzazione sempre più sensibili e accurate. Il genere *Circovirus* rappresenta un ottimo esempio in tal senso. Inizialmente composto da un limitato numero di specie essenzialmente di interesse aviario, attualmente l'ultimo report dell'*International Committee on Taxonomy of Viruses* comprende 49 specie di circovirus che affliggono animali di diverse classi e vi sono evidenze che la coesistenza perduri da milioni di anni. Frequentemente, il riscontro di questi agenti si è rivelato essere meramente accidentale in animali sani e, anche in presenza di sindromi cliniche, il nesso causale non è stato dimostrato nella maggior parte dei casi. Persino l'associazione con la specie ospite, in particolar modo quando l'identificazione è avvenuta a partire da materiale o tratti dell'apparato digerente, è problematica e incerta. Tuttavia, certi circovirus, fra cui alcuni di interesse suino, rappresentano una ragguardevole eccezione, considerando la grande rilevanza clinica e il loro impatto economico (Franz and Segalés, 2020a). In particolare, quella sostenuta dalla specie *Porcine circovirus 2* (PCV-2) è senza dubbio la circovirosi di maggior rilevanza e, più in generale, rappresenta una delle patologie infettive più importanti per l'allevamento suino. Identificato inizialmente in Nord America nella seconda metà degli anni 90 in animali affetti da deperimento sistemico, è stato rapidamente segnalato a livello mondiale in presenza di diverse forme cliniche quali PCV-2-systemic disease (PCV-2-SD) (precedentemente conosciuta come postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) e PCV-2-reproductive disease (PCV-2-RD), globalmente rinominate porcine circovirus diseases (PCVD) (Segalés, 2012; Segalés et al., 2013). Paradossalmente, anche l'infezione asintomatica (PCV-2-SI) viene annoverata fra le PCVD in quanto dannosa per la produttività degli animali. Si stima infatti che le forme asintomatiche siano economicamente più rilevanti di quelle cliniche, al punto che la vaccinazione viene considerata vantaggiosa anche in allevamenti non afflitti da forme cliniche (Alarcon et al., 2013).

AGENTE EZIOLOGICO

Il Porcine circovirus 2 (PCV-2) è un virus sprovvisto di *envelope*, caratterizzato da un genoma circolare ambisenso a singolo filamento di DNA (ssDNA) di circa 1.7kb nel quale sono state identificate un numero limitato di Open Reading Frame (ORFs). Fra queste, quelle di maggior rilevanza sono senza dubbio l'ORF1, codificante tramite *splicing* alternativo per le proteine Rep e Rep', necessarie per la replicazione virale, e ORF2, codificante la

proteina Cap, unico componente del capsido virale, fondamentale per l'adesione virale e sede dei principali determinanti antigenici. In aggiunta, la traduzione di ulteriori ORF è stata dimostrata (ORF3-6). Le rispettive proteine, pur non essenziali, sono implicate nella regolazione della replicazione virale e nella patogenesi, condizionando a vario titolo il ciclo e i processi cellulari, regolando l'apoptosi, interferendo con il *signalling* intra e intercellulare e con l'attivazione e lo sviluppo dell'immunità (Franzo and Segalés, 2020b). Similmente ad altri virus a ssDNA, PCV-2 si caratterizza per il grande potenziale evolutivo, ascrivibile sia ad un elevato tasso di mutazione che di ricombinazione (Franzo et al., 2016a). La fonte primaria di questa eterogeneità si genera a livello del singolo ospite. Lo studio della variabilità virale intra-ospite ha infatti evidenziato come a seguito dell'infezione, a partire da una sottopopolazione principale persistente nel tempo, si originino rapidamente molteplici varianti che "esplorano" diverse soluzioni evolutive. Sebbene la maggior parte di queste rappresentino dei fondi ciechi, alcune possono presentare delle caratteristiche che ne determinano una maggiore fitness e quindi la selezione all'interno dell'individuo e, in taluni casi, ne favoriscono la trasmissione nella popolazione (Correa-Fiz et al., 2018). Similmente, a seguito della coinfezione di un suino con più genotipi o ceppi, la genesi di ceppi ricombinanti è un fenomeno frequente e rapido (Correa-Fiz et al., 2018). Anche in questo caso, le nuove varianti possono presentare un vantaggio evolutivo e diffondersi su larga scala (Franzo et al., 2016a). È interessante sottolineare come non siano gli individui affetti da PCVD ad albergare la maggiore variabilità genetica entro ospite ma bensì gli animali che, pur in presenza di un'elevata carica virale, risultano asintomatici. Tale evidenza, sebbene controintuitiva, risponde perfettamente ai principi alla base della selezione naturale. Perché questa possa avvenire, si rendono necessarie sia grandi popolazioni virali, (i.e. alti titoli virali) sia forti pressioni selettive (come in questo caso, una risposta immunitaria efficiente, in grado di controllare la comparsa di segni clinici) (Correa-Fiz et al., 2020). Ne consegue che le strategie di controllo non possano mirare solamente alla riduzione/prevenzione delle forme cliniche, ma debbano perseguire la limitazione della replicazione e trasmissione virale. Solo seguendo tale principio è infatti possibile prevenire l'evoluzione virale e le minacce che questa comporta, non per il singolo animale o allevamento, ma per il sistema nel suo complesso.

Su scala epidemiologica, il potenziale evolutivo di PCV-2 ha portato all'emergere di una rimarchevole variabilità genetica e fenotipica. Al fine di agevolarne lo studio, sono stati fatti diversi tentativi di semplificare questo scenario, aggregando fra loro ceppi con caratteristiche genetiche simili. Tale processo è stato alla base di diverse problematiche legate sia alla difficoltà di definire criteri di classificazione e nomenclatura condivisi, sia alla necessità di aggiornarli al progredire dell'accumularsi di nuovi dati. A partire dai 2 genotipi inizialmente identificati, l'attuale classificazione riconosce 9 genotipi (PCV-2a/i) sulla base di criteri di distanza genetica e analisi filogenetica del gene ORF2 (Franzo and Segalés, 2018). Fra questi PCV-2a, -2b e -2d sono tradizionalmente considerati genotipi maggiori, in funzione della loro prevalenza a livello mondiale, mantenutasi elevata nel corso del tempo, sebbene con fluttuazioni (vd. prossimo capitolo). I restanti genotipi, definiti minori, vengono riscontrati più sporadicamente, in ristrette aree geografiche e per limitati periodi di tempo (Franzo and Segalés, 2018). Tuttavia, ad oggi, la conoscenza della loro epidemiologia è parziale e la comprensione della loro biologia e dinamiche lungi dall'essere compresa. Recenti studi stanno progressivamente gettando luce su queste tematiche, scardinando molte delle precedenti convinzioni e distinzioni, generando spesso più dubbi che risposte. Due genotipi apparentemente opposti nella loro storia risultano esemplificativi. PCV-2c, identificato inizialmente solamente in campioni di archivio risalenti agli anni 1980-90 (Dupont et al., 2008) è stato a lungo considerato estinto sino al 2015, quando è

stato nuovamente rilevato in pècari campionati nel 2010 nel Pantanal brasiliano (Franzo et al., 2015). Ancor più recentemente, uno studio condotto in Namibia nel 2019-2020 ne ha dimostrato la circolazione, peraltro con elevata frequenza, nei facoceri (Molini et al., 2021). Il riscontro di questo genotipo in aree del mondo e specie non sottoposte a diagnostica routinaria evidenzia come possano esistere nicchie ecologiche in grado di albergare varianti inattese e dal comportamento sconosciuto. Sebbene sia stato ipotizzato che i recenti ceppi di PCV-2c siano gli ultimi discendenti di una popolazione ancestrale, meno adattata alle condizioni del moderno allevamento suino, le reali ragioni per questa ristretta circolazione restano, ad oggi, ignote.

Similmente interessante è il caso di PCV-2e, attualmente il genotipo maggiormente divergente da un punto di vista genetico (Franzo and Segalés, 2018). Sebbene considerato un genotipo minore, è stato riscontrato in diversi stati con crescente frequenza, per quanto risulti difficile differenziare il reale aumento della prevalenza dall'effetto di una più intensiva attività diagnostica e di sequenziamento. PCV-2e non era mai stato riportato in Europa fino al 2022, quando è stato riscontrato incidentalmente in un allevamento italiano, in assenza di segni clinici ascrivibili ad un'etiologia infettiva e senza che fosse possibile identificare delle connessioni epidemiologiche con aree geografiche ove la circolazione fosse stata descritta (Franzo et al., 2022). Un ulteriore tassello è emerso nel corso di uno studio epidemiologico volto a comparare i ceppi circolanti in allevamenti italiani intensivi e rurali, durante il quale è stata dimostrata una significativa circolazione di PCV-2e solo in quest'ultimi. Anche in questo caso, si evidenzia come particolari genotipi o varianti possano circolare, non rilevati, in popolazioni normalmente trascurate dalla routinaria attività diagnostica e che ne hanno permesso il mantenimento nel lungo periodo. Sebbene la trasmissione di PCV-2e agli allevamenti intensivi sia risultata rara, frequenti ed efficaci contatti con animali allevati intensivamente sono stati dimostrati per altri genotipi. In funzione della divergenza genetica e fenotipica di PCV-2e e delle potenziali implicazioni che questa comporta in termini di cross-protezione, anche indotta dalla vaccinazione, deve risultare rafforzata la necessità di monitoraggi più intensivi anche di popolazioni animali la cui rilevanza economica può essere considerata marginale, in quanto possono avere un impatto indiretto molto rilevante se considerate come una minaccia per l'allevamento intensivo.

STORIA DI PCV-2

Diversi studi hanno provato a ricostruire la storia di PCV-2, in particolare dei suoi genotipi maggiori, nel corso del tempo. A dispetto di un'identificazione relativamente recente, sia studi retrospettivi che analisi basate sul così detto "orologio molecolare" hanno chiaramente evidenziato un'origine ben più antica, probabilmente vecchia di secoli e caratterizzata da una sostanziale convivenza fra il virus e il suo ospite (Jacobsen et al., 2009; Franzo et al., 2016a). A partire dagli anni '90, l'aumento della prevalenza di PCV-2, in particolare PCV-2a, e il suo emergere da infezione a vera e propria malattia, è con ogni probabilità da ascrivere in prima istanza all'intensificazione dell'allevamento. Infatti, le PCVD sono il tipico esempio di malattia multifattoriale, ove diversi fattori predisponenti devono essere presenti per l'esplicarsi della sintomatologia clinica. Le nuove condizioni e management degli animali avrebbero posto in essere una serie di condizioni favorevoli sia una maggiore suscettibilità dell'animale che un incremento della pressione infettante. La selezione e diffusione di un numero limitato di razze suine è stata anche chiamata in causa (Segalés et al., 2013; Ellis, 2014). A questa prima fase, all'inizio del nuovo millennio, è seguito un periodo caratterizzato clinicamente dall'aumento nella frequenza e gravità degli outbreak di PCVD e dalla parallela espansione del genotipo PCV-2b, che ha largamente sostituito PCV-2a, un fenomeno ribattezzato primo *genotype shift*. Sebbene una reale associazione fra

caratteristiche genetiche e virulenza sia ancora dibattuta, queste evidenze epidemiologiche suggeriscono che anche le caratteristiche del patogeno abbiano svolto e svolgano un ruolo di grande rilievo nel determinismo della malattia. Infine, un secondo *genotype shift* è stato osservato indicativamente a partire dal 2010, con l'emergere preponderante del genotipo PCV-2d, divenuto al momento quello a maggior prevalenza a livello mondiale (Franzo et al., 2016a). È suggestivo che tale espansione sia seguita all'introduzione e massiva applicazione della vaccinazione nei confronti di PCV-2. Tale evidenza, associata ad alcuni report di apparente insuccesso vaccinale in presenza di questo genotipo, ha suscitato il timore di una minor/scarsa protezione indotta dai vaccini attualmente in commercio nei confronti di questa variante (Xiao et al., 2012). Sebbene ad oggi non vi siano prove di una reale capacità dei nuovi ceppi di eludere la risposta dell'ospite con conseguenze cliniche e/o produttive rilevanti, evidenze di carattere epidemiologico potrebbero sostenere un effetto della vaccinazione nel condizionare l'evoluzione virale e favorire l'emergere di varianti caratterizzate da una fitness differenziale nel nuovo "ambiente vaccinale" (Karuppattan and Opriessnig, 2017; Franzo and Segalés, 2020b).

GENOTIPI, IMMUNITÀ E VACCINI

L'interazione fra PCV-2 e risposta immunitaria è complessa, coinvolge sia l'immunità umorale che cellulo-mediata, e rappresenta uno dei principali determinanti della patogenesi. Nonostante vari epitopi siano stati identificati in tutte le proteine virali, il Cap è il maggior target della risposta immunitaria, in particolare quella umorale, e contiene i principali epitopi neutralizzanti (Kekarainen and Segalés, 2015). Non a caso, i vaccini commercialmente disponibili sono basati su questa regione e hanno dimostrato una straordinaria efficacia, rivoluzionando il controllo dell'infezione. Allo stesso tempo, il capside è sottoposto ad intense pressioni selettive che ne giustificano l'eterogeneità fenotipica (Franzo et al., 2016a; Karuppattan and Opriessnig, 2017). Come precedentemente accennato, questa variabilità, associata a report aneddotici di episodi di PCVD in animali vaccinati, segnalati in presenza di PCV-2d, ha destato notevoli preoccupazioni circa l'emergere di così dette "*escape variants*" e la conseguente perdita di efficacia dei vaccini basati su PCV-2a. Diverse infezioni sperimentali sembrano sconsigliare questa ipotesi, dimostrando piena cross-protezione, prevenzione delle lesioni e segni clinici, riduzione della viremia ed escrezione, indipendentemente dalla combinazione di genotipi usati come vaccino/challenge (Segalés, 2015; Franzo and Segalés, 2020b). La comparsa di segni clinici sarebbe quindi legata a un fallimento della vaccinazione piuttosto che del vaccino. Più recentemente, uno studio appositamente disegnato ha rilevato come la probabilità di isolare un particolare genotipo in apparenti insuccessi vaccinali rifletta essenzialmente la prevalenza complessiva dei genotipi a livello locale nel periodo di tempo considerato (Sibila et al., 2021). Una disamina più approfondita potrebbe però far trasparire un quadro più complesso e, per certi versi, più sfumato. Sebbene i sieri policlonali siano effettivamente cross-reattivi fra genotipi diversi, lo stesso non si può affermare nel caso di anticorpi monoclonali, alcuni dei quali sono specifici per singoli genotipi o addirittura per particolari varianti (Saha et al., 2012). Similmente, anche in studi sperimentali è stata talvolta evidenziata, pur in presenza di una piena protezione clinica, una più elevata viremia o escrezione virale in animali vaccinati con un ceppo eterologo rispetto al *challenge* (Karuppattan and Opriessnig, 2017). I vaccini attualmente disponibili si sono rilevati efficaci anche nel limitare la trasmissione virale e quindi la prevalenza complessiva dell'infezione a livello mondiale (Dvorak et al., 2016). Tuttavia, in termini relativi, la diminuzione di PCV-2a è risultata molto più marcata rispetto a quella di PCV-2b ed in particolare di PCV-2d (Shen et al., 2012; Reiner et al., 2015; Franzo et al., 2016a). Anche in questo caso, una lieve protezione differenziale potrebbe esser implicata. Infine, analisi incentrate sullo studio dell'intensità delle forze selettive hanno evidenziato

una maggior pressione evolutiva, nonché la selezione di particolari sottogruppi virali, dopo l'introduzione della vaccinazione (Franzo et al., 2016b). L'insieme di queste evidenze permette di supporre che effettivamente vi possano essere delle differenze fra ceppi nell'efficacia dell'immunità indotta dai vaccini che, sebbene non necessariamente rilevante per il singolo individuo, condizionino lo scenario epidemiologico complessivo. I vaccini per PCV-2 sono infatti *leaky vaccines*, ossia in grado di conferire protezione clinica, ma non di prevenire l'infezione e la trasmissione virale. Qualora l'animale sia correttamente vaccinato, l'immunità indotta nei confronti di epitopi condivisi risulta con ogni probabilità sufficiente a garantire una piena protezione. Condizioni di vaccinazione sub-ottimali (e.g. errato *timing*, animali stressati, immunosoppressione, co-infezioni, ecc.) potrebbero viceversa esporre maggiormente al rischio di malattia animali infettatisi con ceppi eterologhi rispetto al vaccino. In aggiunta, una vaccinazione sub-ottimale, anche nel caso non esiti nella comparsa di segni clinici, potrebbe favorire la prolungata circolazione virale in un "ambiente vaccinale", favorendo quindi l'adattamento e la differenziazione dei ceppi di campo rispetto a quelli tradizionalmente usati nei vaccini. Si verrebbe infatti a generare lo scenario sopra menzionato, caratterizzato da grandi popolazioni virali in presenza di elevate pressioni selettive, indotte dall'immunità vaccinale. Conseguentemente, sebbene la corretta gestione della vaccinazione rimanga il principale obiettivo da perseguire, sarà utile cercare di monitorare l'evoluzione di PCV-2, poiché non è da escludere che nel tempo possano emergere varianti o genotipi effettivamente in grado di evadere efficacemente l'immunità vaccinale (Franzo and Segalés, 2020b). In tal senso, lo sviluppo di vaccini e protocolli che offrano un'ampia cross-protezione e limitino quanto più possibile la replicazione virale, oltre che la sintomatologia, potrebbe rappresentare una valida assicurazione nella prevenzione di questi fenomeni evolutivi (Franzo et al., 2019).

CONCLUSIONI

Nonostante PCV-2 sia con ogni probabilità un virus estremamente antico e le nostre conoscenze risalgano ormai a diversi decenni fa, le sfide che continua a porci sono molteplici e sono in larga parte da ascrivere al suo grande potenziale evolutivo. Questo, combinato alle caratteristiche del moderno allevamento intensivo e ai sistemi di controllo applicati, espone continuamente alla comparsa di nuove varianti maggiormente adattate alle condizioni della moderna suinicoltura e quindi più difficili da controllare. Similmente si è potuto osservare come diverse nicchie ecologiche, dagli allevamenti rurali alle specie selvatiche, possano albergare genotipi e varianti dal comportamento scarsamente prevedibile e che potrebbero rappresentare una futura minaccia anche per l'allevamento intensivo. A fronte di queste minacce, le armi a nostra disposizione sono molteplici ed efficaci. La rigorosa applicazione dei protocolli di biosicurezza e vaccinazione già disponibili è sicuramente prioritaria in quanto, oltre a prevenire/contenere le perdite produttive nell'immediato, limita le dimensioni della popolazione di PCV-2 e rappresenta un efficace ostacolo all'evoluzione virale. Lo sviluppo e l'applicazione di nuovi vaccini che garantiscano una maggior protezione nei confronti di multipli genotipi potrebbe ulteriormente contribuire a prevenire la replicazione virale anche in condizioni di vaccinazione sub-ottimale. Infine, non può essere trascurata l'importanza di un continuo monitoraggio dell'epidemiologia molecolare di PCV-2, non limitandosi meramente ai contesti intensivi e/o clinici, ma investendo risorse anche nello studio della circolazione virale in animali subclinici e in altre popolazioni non convenzionali che potrebbero albergare varianti inattese, la cui conoscenza rappresenta un imprescindibile strumento per non risultare impreparati rispetto alle sfide future che questo virus continuerà a presentare.

BIBLIOGRAFIA

1. Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. *Prev Vet Med* 110, 88–102. doi:10.1016/J.PREVETMED.2013.02.010
2. Correa-Fiz, F., Franzo, G., Llorens, A., Huerta, E., Sibila, M., Kekarainen, T., Segalés, J., 2020. Porcine circovirus 2 (PCV2) population study in experimentally infected pigs developing PCV2-systemic disease or a subclinical infection. *Sci Rep* 10. doi:10.1038/s41598-020-74627-3
3. Correa-Fiz, F., Franzo, G., Llorens, A., Segalés, J., Kekarainen, T., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genetic variability under natural infection scenario reveals a complex network of viral quasispecies. *Sci Rep* 8, 15469. doi:10.1038/s41598-018-33849-2
4. Dupont, K., Nielsen, E.O., Bækbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128, 56–64. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.016
5. Dvorak, C.M.T., Yang, Y., Haley, C., Sharma, N., Murtaugh, M.P., 2016. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Vet Microbiol* 189, 86–90. doi:10.1016/j.vetmic.2016.05.002
6. Ellis, J., 2014. Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Vet Pathol* 51, 315–327. doi:10.1177/0300985814521245
7. Franzo, G., Cortey, M., Castro, A.M.M.G. de, Piovezan, U., Szabo, M.P.J., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol* 178, 158–162. doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.003
8. Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M., 2016a. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogenet Evol* 100, 269–280. doi:10.1016/j.ympev.2016.04.028
9. Franzo, G., Legnardi, M., Tucciarone, C.M., Drigo, M., Martini, M., Cecchinato, M., 2019. Evolution of infectious bronchitis virus in the field after homologous vaccination introduction. *Vet Res* 50. doi:10.1186/s13567-019-0713-4
10. Franzo, G., Segalés, J., 2020a. Circoviruses (Circoviridae), in: Bamford, D.H., Zuckerman, M. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Science, pp. 182–192.
11. Franzo, G., Segalés, J., 2020b. Porcine circovirus 2 genotypes, immunity and vaccines: Multiple genotypes but one single serotype. *Pathogens* 9, 1–12. doi:10.3390/pathogens9121049
12. Franzo, G., Segalés, J., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One* 13, e0208585. doi:10.1371/journal.pone.0208585
13. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci Rep* 6, 39458. doi:10.1038/srep39458
14. Franzo, G., Ustulin, M., Zanardelli, P., Castellan, A., Villa, N., Manfreda, A., Vio, D., Drigo, M., 2022. First detection of porcine circovirus type 2e in Europe. *Veterinary Journal* 279. doi:10.1016/j.tvjl.2022.105787
15. Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W., 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 138, 27–33. doi:10.1016/j.vetmic.2009.02.005

16. Karuppanan, A.K., Opriessnig, T., 2017. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. *Viruses* 9, 99. doi:10.3390/v9050099
17. Kekarainen, T., Segalés, J., 2015. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine Health Manag* 1, 17. doi:10.1186/s40813-015-0012-z
18. Molini, U., Franzo, G., Gous, L., Moller, S., Hemberger, Y.M., Chiwome, B., Marruchella, G., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G., 2021. Three different genotypes of porcine circovirus 2 (PCV-2) identified in pigs and warthogs in Namibia. *Arch Virol* 166, 1723–1728. doi:10.1007/s00705-021-05035-9
19. Reiner, G., Hofmeister, R., Willems, H., 2015. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Vet Microbiol* 180, 41–48. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.026
20. Saha, D., Huang, L., Bussalleu, E., Lefebvre, D.J., Fort, M., van Doorselaere, J., Nauwynck, H.J., 2012. Antigenic subtyping and epitopes' competition analysis of porcine circovirus type 2 using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 157, 13–22. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.030
21. Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev Vaccines* 14, 473–487. doi:10.1586/14760584.2015.983084
22. Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164, 10–19. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.007
23. Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M., 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol* 165, 13–20. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.033
24. Shen, H.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *Journal of General Virology* 93, 1345–1355. doi:10.1099/vir.0.039552-0
25. Sibila, M., Rocco, C., Franzo, G., Huerta, E., Domingo, M., Núñez, J.I., Segalés, J., 2021. Genotyping of porcine circovirus 2 (Pcv-2) in vaccinated pigs suffering from pcv-2-systemic disease between 2009 and 2020 in Spain. *Pathogens* 10. doi:10.3390/pathogens10081016
26. Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 2b Variant Present in Cases of Vaccine Failures in the United States. *J Virol* 86, 12469–12469. doi:10.1128/JVI.02345-12