

CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2: MALATTIA SISTEMICA IN SUINI VACCINATI PER PCV2

TORREGGIANI C.¹, PELLACINI M.², D'ANNUNZIO G.¹, BASSI P.¹, GABBI V.¹,
MANFREDI R.¹, PROSPERI A.¹, CHIAPPONI C.¹, LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER);
²Ferrero Mangimi;

INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è il principale agente eziologico di un gruppo di malattie note come malattie associate al circovirus suino (PCVD) che comprendono la malattia sistemica (PCV2-SD), la dermatite e nefrite suina (PDNS), la malattia riproduttiva (PCV2-RD) e infine l'infezione sub-clinica (PCV2-SI) (Segalés, 2012). La PCV2-SD e PCV2-SI sono le condizioni patologiche più importanti dal punto di vista economico (Alarcon et al., 2013). Sebbene la vaccinazione contro il PCV2 abbia drasticamente ridotto l'impatto della PCVD, la diagnosi di PCV2-SD è estremamente importante, soprattutto per essere differenziata da altre cause di deperimento e da forme di PCV2-SI. I criteri diagnostici per PCV2-SD comprendono (Segalés et al., 2005 e Segalés et al., 2022):

- la presenza di segni clinici compatibili con la malattia (ritardo di crescita, deperimento e segni clinici respiratori e/o digestivi);
- l'osservazione di caratteristiche lesioni istologiche nei tessuti linfoidi ed eventualmente in altri tessuti (deplezione linfocitaria, infiltrazione di elementi macrofagico-istiocitari, eventuale presenza di cellule multinucleate e inclusioni anfofile intracitoplasmatiche);
- la dimostrazione della presenza dell'agente eziologico nelle lesioni caratteristiche, attraverso la dimostrazione di quantità da moderate a elevate di antigene di PCV2 nei tessuti linfoidi.

È interessante sottolineare come in uno studio condotto sulla valutazione quantitativa di PCV2 nei tessuti a scopo diagnostico, sono stati proposti come *cut off* per diagnosticare forme di PCV2-SD tramite qPCR, livelli di $10^{6,8-8,4}$ copie di DNA virale/gr. nei tessuti linfoidi e non linfoidi (Harding et al., 2008).

Attualmente, e sulla base del sequenziamento dell'*open reading frame 2* (ORF2), sono stati descritti fino a nove diversi genotipi di PCV2 (Franzo e Ségalés, 2018; Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). Tra questi, PCV2a, PCV2b e PCV2d mostrano una distribuzione globale e sono considerati i più diffusi (Wang et al., 2020b) mentre i restanti sono stati rilevati molto più sporadicamente e in aree molto limitate (Franzo e Segalés, 2018). Nel 1996 il genotipo più frequente nei suini era il PCV2a, ma nel periodo 2000-2004 si è verificato un graduale incremento del genotipo PCV2b, a scapito di PCV2a, a livello globale (Dupont et al., 2008; Carman et al., 2008; Timmusk et al., 2008; Cortey et al., 2009). Questo cambiamento di prevalenza con predominanza del genotipo PCV2b si è verificato quando non era ancora disponibile alcuna vaccinazione contro il PCV2 ed è stato associato a focolai di malattia più gravi. Dal 2010, il PCV2b è stato gradualmente sostituito dal PCV2d (Xiao et al., 2013; Franzo et al., 2016; Tsai et al., 2019). Quest'ultimo genotipo è stato proposto come potenziale causa di "fallimenti vaccinali" (Opriessnig et al., 2013) ma anche suggerito come genotipo con virulenza aumentata (Ssemadaali et al., 2015). Tuttavia, successivi studi sperimentali hanno dimostrato che il PCV2d non sfuggirebbe all'immunità conferita dai vaccini basati sul genotipo PCV2a (Opriessnig et al., 2013; Park et al., 2019), mostrando virulenza sovrapponibile a quella del PCV2a e del PCV2b (Cho et al., 2020).

La vaccinazione di suinetti, scrofette e scrofe contro il PCV2 è una pratica comune in tutto il

mondo. La maggior parte dei vaccini impiegati si basa sul genotipo PCV2a. Questi vaccini possono prevenire la malattia (PCV2-SD) ma non l'infezione (Opriessnig et al., 2020). Tuttavia, casi di PCV2-SD sono occasionalmente diagnosticati negli allevamenti vaccinati e gli interrogativi sulle cause che possono limitare la protezione vaccinale nei confronti di PCV2 sono ancora oggetto di dibattito tra i veterinari del settore.

Il presente lavoro descrive un caso clinico di malattia da PCV2 (PCV2-SD) in un sito 3 di un allevamento multi-sito in provincia di Brescia.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico descritto nel presente lavoro ha interessato un sito 3 appartenente ad un allevamento multi-sito della provincia di Brescia. I capi da ingrasso mediamente presenti nel sito 3 erano 2000, e provenivano dal sito 2, dal quale venivano movimentati a partire da 90 giorni d'età. Dal sito 1, 1500 suini venivano settimanalmente spostati nel sito 2 al peso di circa 7 kg. Il sito 2 conteggiava un totale di circa 9000 capi.

Il piano vaccinale nelle scrofe prevedeva la vaccinazione nei confronti di:

- PRRSV, con vaccino vivo attenuato (MLV), 5 interventi all'anno;
- PCV2, 2 interventi all'anno;
- Influenza suina (sottotipi H1N1, H1N2, H3N2), 2 interventi all'anno;
- rinite atrofica progressiva (RAP), due interventi a 70 e 90 giorni di vita;
- mal rossino e parvovirus, in sala parto.

Nei suinetti in sala parto veniva eseguito vaccino combinato PCV2/*Mycoplasma hyopneumoniae* intorno al ventesimo giorno di vita.

È interessante sottolineare che gli animali provenienti dal sito 1, ed introdotti nel sito 2, a partire da giugno 2022 non mostravano anticorpi nei confronti del virus della PRRS, a causa di una graduale negativizzazione nei confronti del virus nel sito 1 e questo era confermato dai risultati ottenuti con il continuo monitoraggio su emosieri testicolari e sangue dei suinetti sottoscrofa, rispettivamente con *real time* qPCR e ELISA sierologica (PRRS IDEXX). Questo ha comportato la comparsa di problematiche sanitarie, caratterizzate da viremie da PRRSV e febbre 40-40,5°C, in animali dopo una settimana dall'introduzione nel sito 2, con perdite che si attestavano intorno al 10%, a causa probabilmente di una ri-circolazione virale dai gruppi di suinetti più vecchi a quelli di più recente introduzione, che giungevano nel sito 2 senza una sufficiente protezione anticorpale di derivazione materna.

Gli animali arrivati nel sito 2 a maggio e movimentati a fine luglio nel sito 3, dopo una settimana dall'arrivo mostravano tosse secca, dispnea, formazione di scarti. I suini si mostravano refrattari ai diversi e ripetuti trattamenti eseguiti con l'impiego di florfenicolo (10 mg/kg BW per 5 giorni), doxiciclina (10 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime), trimetoprim (2 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime) + sulfamidico (10 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime), lincomicina (10 mg/kg BW per 7 giorni, nel mangime), amoxicillina (20 mg/kg BW per 5 giorni, nel mangime) e paracetamolo (30 mg/kg BW per 5 giorni).

I suini movimentati nel sito 3 a luglio ed inviati al macello tra metà gennaio ed inizio febbraio 2023, hanno evidenziato un'età media al carico di 281 giorni e un incremento ponderale giornaliero (I.P.G.) di 0,770 kg. È stata eseguita inoltre, su una partita di suini macellata a gennaio, la valutazione delle lesioni polmonari al macello (*lung scoring*) applicando la griglia Madec, per la punteggiatura delle lesioni broncopolmonari e SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System) per la valutazione delle pleuriti. In particolare, quest'ultima ha evidenziato un'elevata incidenza di pleuriti croniche sia a localizzazione dorso-caudale sia ventro-craniale.

Indagini di laboratorio

A fine agosto ed inizio settembre 2 suini provenienti dal sito 3, presentanti deperimento e sindrome respiratoria caratterizzata da dispnea e tosse secca, sono stati sottoposti a necrosco-

pia in campo. All'esame anatomopatologico i suini presentavano scadente stato di nutrizione, pelo lungo e linfadenomegalia dei linfonodi inguinali superficiali. All'apertura della cavità addominale si osservava lieve epatomegalia e splenomegalia, linfadenomegalia dei linfonodi ischiatici e meseraici. All'apertura della cavità toracica la valutazione dei polmoni evidenziava un quadro macroscopico caratterizzato da edema a livello dell'interstizio polmonare e bronco-polmonite catarrale a livello delle porzioni apicali dei lobi craniali e medi in forma bilaterale, inoltre si evidenziava un quadro di linfadenomegalia dei linfonodi tracheo-bronchiali. Milza, polmone, linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali sono stati prelevati durante la necropsia e conferiti presso i laboratori IZSLER della sede di Parma per indagini di laboratorio, principalmente volte a confermare il sospetto di PCV2-SD formulato sulla base del quadro clinico osservato e delle lesioni anatomopatologiche descritte.

La milza ed il polmone sono stati sottoposti ad esame batteriologico attraverso metodi routinari e al termine del periodo d'incubazione di 48 ore a 37°C, non è stata rilevata la crescita di agenti patogeni sui terreni colturali impiegati (agar sangue a Gassner agar).

Per ogni suino un *pool* di campioni linfonodali (linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali) è stato sottoposto a PCR *real time* quantitativa (qPCR) per PCV2 (Olvera et al, 2004). I *pool* di campioni linfonodali prelevati dal suino n. 1 e n. 2 sono risultati positivi per PCV2, con un numero di copie di DNA virale/gr. pari a $1,4 \times 10^{13}$ e $5,3 \times 10^{14}$ rispettivamente. Campioni di milza, linfonodi inguinali, ischiatici, mesenterici e tracheo-bronchiali e di polmone sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina dopo opportuna processazione. Dai tessuti inclusi in paraffina sono state ricavate sezioni di 5 µm di spessore successivamente colorate con Ematossilina-Eosina e valutate al microscopio ottico. Nei diversi campioni linfonodali esaminati i quadri microscopici erano caratterizzati da deplezione linfoide e infiltrazione di cellule macrofagico-istiocitarie con presenza di cellule epitelioidi e giganti multinucleate a localizzazione centro-follicolare (figura 1).

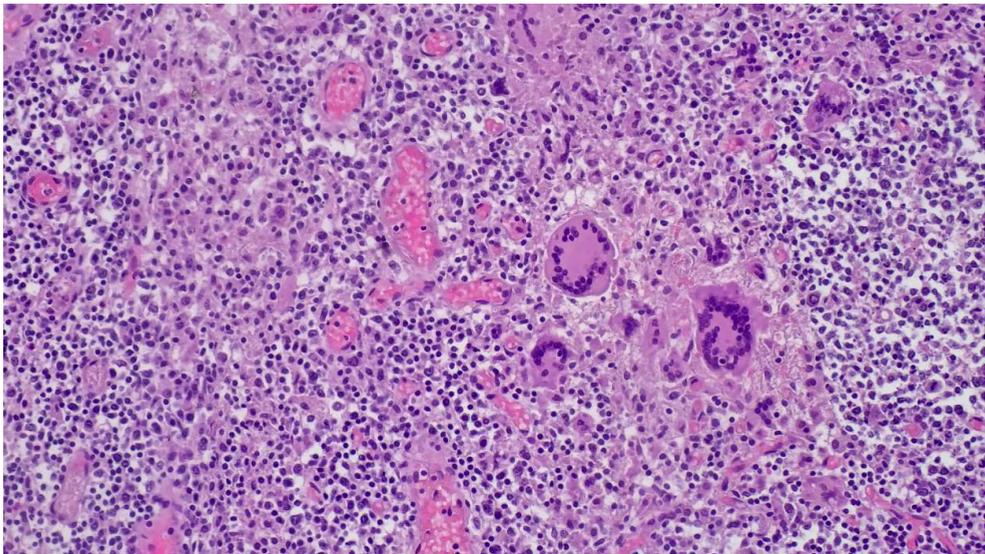


Figura 1. Suino affetto da PCV2-SD. Linfonodo inguinale superficiale con grave deplezione linfoide e scomparsa dei follicoli, rarefazione cellulare del tessuto interfollicolare e infiltrazione di elementi macrofagico-istiocitari e cellule giganti multinucleate (Ematossilina-Eosina, 40x).

Quadri di deplezione linfoide si osservavano inoltre a livello della milza, mentre il parenchima polmonare mostrava quadri di polmonite interstiziale alveolo-settale con ispessimento dei setti alveolari per infiltrazione di cellule linfocitarie e macrofagiche. Sezioni di 5 µm dei diversi distretti linfonodali campionati, della milza e del polmone sono state destinate ad indagini immunohistochimiche (IHC) per PCV2. La prova ha previsto l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (mAb 1A5) prodotto presso il reparto di biotecnologie dell'IZSLER. In sintesi: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; lo smascheramento antigenico è stato eseguito con l'impiego di proteinasi K e incubazione a 37°C. A seguire le sezioni sono state sottoposte a trattamento con *protein block* (caseina 0,4% in tampone fosfato) seguito da incubazione *overnight* a 4°C dei preparati con anticorpo primario diluito 1:1000. Le sezioni sono state quindi trattate con il sistema di rilevazione in perossidasi, (anticorpo secondario e complesso streptavidina-biotina-perossidasi; *Novolink Detection System Max Polymer*, Leica) e la reazione è stata evidenziata utilizzando il cromogeno NovaRED (Vector). Le sezioni sono state contrastate con Ematossilina di Mayer, disidratate e opportunamente montate come da procedura standard. Le diverse sezioni linfonodali mostravano reazione immunohistochimica positiva per PCV2, con positività citoplasmatica nelle cellule macrofagiche e giganti multinucleate (figura 2) per l'antigene di PCV2 nel tessuto linfoide depleto, distribuita a livello centro-follicolare o concentrata in macrofagi nei seni peri-trabecolari.

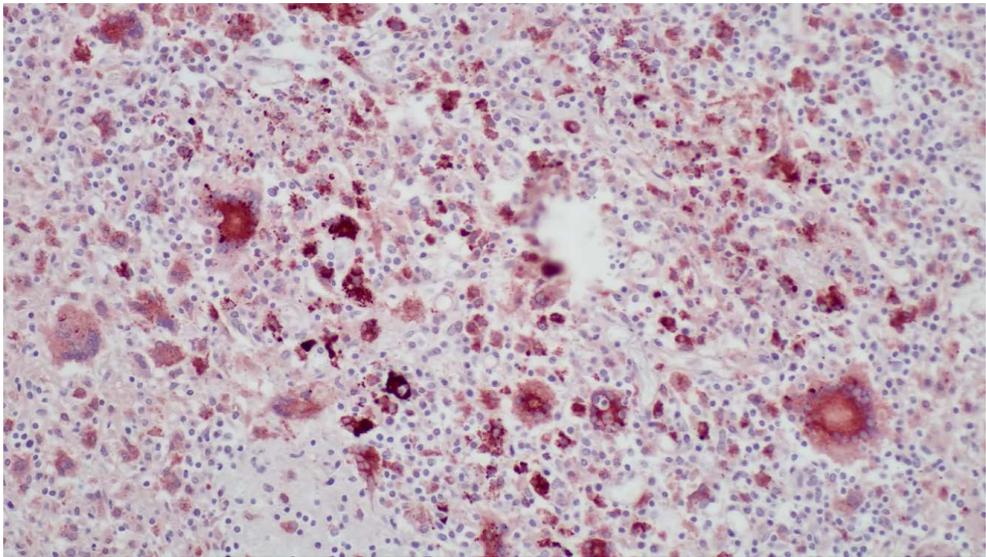


Figura 2. Suino affetto da PCV2-SD. Linfonodo inguinale superficiale. Reazione immunohistochimica per PCV2. Positività citoplasmatica per PCV2, concentrata in macrofagi e cellule giganti multinucleate centro-follicolari, si osserva nel tessuto linfoide depleto, (40x).

Positività immunohistochimica per PCV2 si rilevava a livello splenico nelle cellule macrofagiche e a livello polmonare nel citoplasma dei macrofagi dell'infiltrato infiammatorio peri-bronchiolare.

I risultati delle indagini di laboratorio, sulla base dei criteri diagnostici aggiornati da Segalés e Sibila (2022), hanno indirizzato la diagnosi verso una forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD).

Successivamente alla conferma della diagnosi di PCV2-SD veniva implementata, in sala parto, in suinetti di 10-15 giorni di vita, la vaccinazione per PRRSV, per prevenire gli effetti negativi legati alla circolazione del virus dopo l'ingresso degli animali nel sito 2, come descritto precedentemente. Contemporaneamente è stato impostato un intervento vaccinale aggiuntivo per PCV2 nel sito 3, in animali di circa 90-110 giorni d'età. Questo ha contribuito, con ogni probabilità, a riportare la situazione sanitaria alle condizioni precedenti il focolaio di PCV2-SD.

DISCUSSIONE

Il caso clinico descritto nel presente lavoro riporta le caratteristiche di un episodio di malattia da PCV2 (PCV2-SD) in un sito 3 di un allevamento multi-sito, in cui veniva praticata la vaccinazione per PCV2 sia nelle scrofe che nei suinetti a 20 giorni d'età. Segalés (2020) riporta che negli ultimi anni è stato notato un aumento di casi di PCV2-SD in allevamenti in cui veniva praticata la vaccinazione. In alcuni casi è possibile ipotizzare che la vaccinazione allo svezzamento non lasci tempo sufficiente all'organismo perché questo possa sviluppare un'adeguata risposta immunitaria vaccinale prima dell'infezione naturale e una percentuale degli animali possa sviluppare PCV2-SD e non solo forme sub-cliniche (PCV2-SI). In questi casi la raccomandazione è di eseguire la vaccinazione nelle scrofe, cercando di ritardare l'infezione naturale da PCV2 o di anticipare la vaccinazione contro il PCV2 (ad esempio a 10-15 giorni di vita) (Segalés, 2020). Quest'ultima opzione dovrebbe essere associata ad una valutazione del livello di anticorpi verso PCV2 negli animali prima di procedere con la vaccinazione. Infatti, una vaccinazione troppo precoce non è priva di rischi, per la potenziale interferenza con l'immunità passiva di origine materna. Per le conoscenze attuali si ritiene che il "fallimento della vaccinazione" sia per lo più associato ad una inadeguata gestione del vaccino (conservazione, dose applicata, ecc.) e al *timing* della vaccinazione stessa (precoce, con potenziale interferenza con l'immunità di origine materna o tardiva, ad esempio troppo vicina all'infezione naturale) o in corso di concomitanti infezioni da parte di agenti patogeni immunodepressivi, come ad esempio PRRSV. Occorre perciò, prima di tutto, guardare al cosiddetto "fallimento vaccinale" come ad un problema gestionale piuttosto che a un problema di reale inefficacia del vaccino.

L'allevamento oggetto dei casi di PCV2-SD eseguiva la vaccinazione per PCV2 sia nelle scrofe (2 trattamenti all'anno) che nei suinetti (unico trattamento a 20 giorni di vita).

La vaccinazione delle scrofe ha principalmente due obiettivi: prevenire forme di PCVD precoci nei suinetti e prevenire casi di malattia riproduttiva da PCV2 (PCV2-RD). Nel primo caso, la vaccinazione dovrebbe avvenire alla fine della gestazione, mentre se l'obiettivo è prevenire il PCV2-RD, la vaccinazione potrebbe essere applicata prima dell'accoppiamento, nel periodo di allattamento o allo svezzamento per le scrofe di primo parto o più anziane, o durante l'acclimatamento nelle scrofette.

La profilassi delle diverse forme di PCVD in allevamento passa, nella maggior parte dei casi, dalla vaccinazione dei suinetti, con effetti benefici più rapidi sulla popolazione, andando ad indurre una risposta immunitaria protettiva nei soggetti a rischio di sviluppare forme di PCVD.

Un'altra opzione è procedere con la vaccinazione sia delle scrofe che dei suinetti. Diversi studi riportano gli effetti benefici di questa pratica sulle *performance* produttive. Questa strategia vaccinale unisce i vantaggi del controllo del PCVD in una modalità di "protezione continua", in grado di proteggere i suinetti dallo sviluppo di PCV2-SD e migliorare l'esito di PCV2-SI (Segalés, 2020).

In questo scenario, che prevede la doppia vaccinazione (scrofe e suinetti), è importante prendere in considerazione la possibile interferenza dell'immunità di derivazione materna (MDI)

sull'efficacia del vaccino per PCV2 nei suinetti, poiché l'assunzione di colostro da scrofe vaccinate fornisce ai suinetti stessi maggiori quantità di anticorpi nei confronti di PCV2. Tuttavia, è vero che i livelli di anticorpi di origine materna (MDA) devono essere molto elevati al fine di compromettere gli effetti della vaccinazione verso PCV2 nei suinetti, e questo è ovviamente anche legato alla tempistica di vaccinazione in questi ultimi (Segalés, 2020).

Un aspetto molto interessante, che merita un breve approfondimento, è la tendenza negli anni alla variazione dei genotipi di PCV2 responsabili di focolai di malattia a livello mondiale. Come già accennato le sequenze del virus a disposizione confermavano una maggiore frequenza di PCV2a durante gli anni '90, di PCV2b durante gli anni 2000 e di PCV2d dal 2010 al 2012 (Sibila et al., 2021). Quest'ultimo genotipo è stato proposto come potenziale causa di fallimenti vaccinali (Opriessnig et al., 2013), ma anche suggerito come genotipo con virulenza aumentata (Ssemadaali et al., 2015). Tuttavia, successivi studi sperimentali hanno dimostrato che PCV2d non sfuggirebbe all'immunità conferita dai vaccini basati sul genotipo PCV2a (Opriessnig et al., 2013; Park et al., 2019), mostrando virulenza sovrapponibile a quella di PCV2a e PCV2b (Cho et al., 2020). Sibila et al. (2021), riporta come i risultati di uno studio spagnolo, condotto su casi di PCV2-SD tra il 2009 e il 2020, che descrive una maggiore frequenza del genotipo PCV2d in animali vaccinati e colpiti da forme di PCV2-SD, rifletta semplicemente la maggiore prevalenza di questo genotipo durante il periodo considerato, piuttosto che un potenziale fallimento del vaccino dovuto alla mancata protezione degli animali nei confronti del genotipo PCV2d.

In conclusione, il presente caso descrive un focolaio di PCV2-SD in un allevamento suino in cui veniva praticata la vaccinazione per PCV2 nelle scrofe (2 trattamenti all'anno) e nei suinetti a 20 giorni di vita. Le informazioni disponibili non permettono di individuare in maniera inequivocabile le cause della scarsa protezione fornita dalla vaccinazione in questo specifico caso, tuttavia è probabile che la condizione osservata sia da imputare a forme di immunodepressione causate dall'infezione da PRRSV, descritta nei suini dopo una settimana dall'arrivo nel sito 2 ossia circa 2 settimane dopo la vaccinazione per PCV2 eseguita nel sito 1 all'età di 20 giorni. Questo potrebbe aver interferito con lo stabilirsi di una solida immunità protettiva vaccinale.

Altro aspetto da considerare, ma che non è possibile confermare con gli elementi a disposizione, è la possibile interferenza dell'immunità colostrale, fornita dalle scrofe vaccinate per PCV2 ai suinetti. Le misure implementate dopo la diagnosi PCV2-SD, caratterizzate dalla vaccinazione per PRRSV nei suinetti in sala parto (10-15 giorni di vita) ed intervento vaccinale aggiuntivo per PCV2 nel sito 3, in animali di circa 90-110 giorni d'età, hanno permesso di riportare le perdite nel sito 3 entro limiti accettabili.

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.
2. Carman S., Cai H.Y., Delay J., Youssef S.A., McEwen B.J., Gagnon C.A., Tremblay D., Hazlett M., Lusia J., Fairles J., et al. (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004–2006. *Can. J. Vet. Res.* 72, 259–268.
3. Cho H., Kang I., Oh T., Yang S., Park K.H., Min K.D., Ham H.J., Chae C. (2020). Comparative study of the virulence of 3 major Korean porcine circovirus type 2 genotypes (a, b, and d) *Can. J. Vet. Res.* 84, 235–240.
4. Cortey M., Pileri E., Sibila M., Pujols J., Balasch M., Plana J., Segales J. (2011). Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV2a to PCV2b in Spain from 1985 to

2008. *Vet. J.* 187, 363–368.
5. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. (2020). 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.
 6. Franzo G., Cortey M., Segales J., Hughes J., Drigo M. (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinants forms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 269–280.
 7. Franzo G., Segales J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS ONE.* 2018;13:e0208585.
 8. Harding J.C., Baker C.D., Tumber A., McIntosh K.A., Parker S.E., Middleton D.M., Hill J.E., Ellis J.A., Krakowka S. (2008). Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity and nucleocapsid staining intensity. *J. Vet. Diagn. Investig.* 20, 274–282.
 9. Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Domingo M. (2004). “Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a Real Time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs”. *J Virol Methods.* 117, 75–80
 10. Opriessnig T., Karuppanan A.K., Halbur P.G., Calvert J.G., Nitzel G.P., Matzinger S.R., Meng X.J. (2020). Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. *Vaccine.* 38, 1975–1981.
 11. Opriessnig T., Langohr I. (2013). Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Vet. Pathol.* 50, 23–38.
 12. Park K.H., Oh T., Yang S., Cho H., Kang I., Chae C. (2019). Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. *Vet. Microbiol.* 231, 87–92.
 13. Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19.
 14. Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
 15. Segalés, J. (2020). ‘Porcine Circoviruses in 2020: What’s new?’ In: Stingelin, G.M., Guilherme de Oliveira, L., Montenegro Franceschini V. ‘Swine Health and Production: Updating, Innovation and Technology’, pp. 4-9.
 16. Segalés, J., Sibila, M. (2022). Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet Sci.* 9, 110.
 17. Sibila M., Rocco C., Franzo G., Huerta E., Domingo M., Núñez J.I., Segalés J. (2021). Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. *Pathogens.* 10, 1016.
 18. Ssemadaali M.A., Ilha M., Ramamoorthy S. (2015). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. *Res. Vet. Sci.* 103, 179–186.
 19. Timmusk S., Wallgren P., Brunborg I.M., Wikstrom F.H., Allan G., Meehan B., McMenemy M., McNeilly F., Fuxler L., Belak K., et al. (2008). Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) *Virus Genes.* 36, 509–520.
 20. Tsai G.T., Lin Y.C., Lin W.H., Lin J.H., Chiou M.T., Liu H.F., Lin C.N. (2019). Phylogeographic and genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan from 2001–2017. *Sci. Rep.* 9, 10782.
 21. Wang S., Xin C., Wu X., Shi J., Peng Z., Sun P., Wang Y., Xu S., Yang Y., Zhang F. (2020). Genetic characterization of Porcine circovirus type 2 from 2013 to 2018 in Shandong Province, China. *Vet. Med. Sci.* 6, 76–81.

22. Wang Y., Noll L., Lu N., Porter E., Stoy C., Zheng W., Liu X., Peddireddi L., Niederwerder M., Bai J. (2020). Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1284–1294.
23. Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J. Gen. Virol.* 96, 1830–1841.