

COMMERCIO INTERNAZIONALE, EVOLUZIONE E DISSEMINAZIONE VIRALE: ANALISI DELL'ETERogeneITÀ DI PCV2 IN ITALIA

INTERNATIONAL TRADES, LOCAL SPREAD AND VIRAL EVOLUTION: THE CASE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) STRAINS HETEROGENEITY IN ITALY

*TUCCIARONE C.¹, *FRANZO G.¹, DOTTO G.¹, GIGLI A.², CEGLIE L.², DRIGO M.¹

*Equally contributing authors

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS)
Università degli Studi di Padova;*

²*Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe), 35020 Legnaro, Italy.*

Parole chiave: PCV2, Italia, epidemiologia, filogeografia.

Keywords: PCV2, Italy, epidemiology, phylogeography.

Riassunto

L'infezione da PCV2 è attualmente una di quelle più diffuse ed economicamente onerose del comparto suinicolo. Finora sono stati distinti quattro genotipi, di cui solo tre circolano effettivamente. Il commercio di bestiame e la rapida evoluzione virale hanno contribuito a determinarne l'elevata eterogeneità e la distribuzione di ceppi potenzialmente più virulenti.

Questo studio, volto a colmare la mancanza di informazioni sull'epidemiologia di PCV2 in Italia, ha preso in considerazione 75 sequenze del genoma completo, ottenute da campioni raccolti in Nord Italia tra il 2007 e il 2014. Le analisi filogenetiche, basate anche sul confronto con altre sequenze depositate in database pubblici, hanno dimostrato la co-circolazione di PCV2a, 2b e 2d entro i confini nazionali, con maggior prevalenza del genotipo 2b.

Le analisi filogenetiche, la localizzazione dei diversi aplotipi e le rotte commerciali internazionali, hanno quindi permesso di proporre svariati collegamenti e il ruolo dell'Italia come importatore ed esportatore di aplotipi di PCV2, primariamente da e verso Stati Europei e Asiatici. Una rete di connessioni ugualmente intricata è emersa anche entro i confini nazionali. Essenzialmente, questo articolo rappresenta la prima descrizione del panorama epidemiologico italiano legato a PCV2, dimostrando come l'elevata variabilità dei ceppi circolanti in Italia sia riconducibile a vari eventi di introduzione, all'ampia circolazione virale entro i confini nazionali e alla rapida evoluzione del virus.

Abstract

PCV2 infection is currently one of the most widespread and economically important for the pig industry. To date, four different genotypes have been recognized, but only three of these are actually circulating. Trading and rapid viral evolution have contributed to determine the high heterogeneity and distribution of potentially more virulent strains.

This study, aimed to fill the lack of information regarding the epidemiology of PCV2 in Italy, took into account 75 complete genome sequences obtained from samples collected in northern Italy between 2007 and 2014. The phylogenetic analysis, also based on the comparison with other sequences from public databases, have demonstrated the co-circulation of PCV2a, 2b and 2d within national boundaries, with higher prevalence of genotype 2b.

Phylogenetic analyses, the localization of the different haplotypes and international trade routes,

allowed to propose various connections and the role of Italy as an importer and exporter of haplotypes of PCV2, from and to other European and Asian countries. A complex network of connections emerged also within national borders. Essentially, this article represents the first description of the Italian epidemiology related to PCV2, showing how the high variability of the strains circulating in Italy is due to various events of introduction, extensive viral circulation within the national borders and the rapid evolution of the virus.

INTRODUZIONE

Il virus *Porcine circovirus type 2* (PCV2) è l'agente eziologico di una delle più importanti malattie infettive dei suini, ed è causa di ingenti perdite economiche attribuibili alla presenza di sindromi cliniche e subcliniche e all'attuazione di misure di controllo ad esse rivolte (Alarcon et al., 2013). PCV2 è un virus a singolo filamento di DNA privo di envelope, classificato nella famiglia *Circoviridae*, genere *Circovirus*, ed è l'unico in questo gruppo in grado di provocare malattia nei mammiferi. Il genoma virale è circolare e ambisenso, con dimensioni ridotte comprese tra i 1766-1768 nucleotidi e codifica 4 proteine principali (ORF1-4) (Lv et al., 2014).

Dal momento della sua emergenza all'inizio degli anni '90 PCV2 è stato messo in relazione a numerose sindromi, raggruppate nella definizione di Porcine Circovirus Diseases (Segales et al., 2012). Dopo le prime segnalazioni, l'infezione sostenuta da PCV2 è stata riportata in tutto il mondo e ha raggiunto proporzioni epidemiche in Europa e nel Sud-Est Asiatico alla fine degli anni '90 e in Nord e Sud America negli anni 2004-2005 (Segales et al., 2013).

Sulla base di precedenti studi filogenetici, è stata proposta una classificazione di PCV2 che ripartisce gli stipti virali in quattro genotipi principali: PCV2a, PCV2b, PCV2d e PCV2c (Franzo et al., 2014b). I primi tre hanno manifestato una distribuzione mondiale (Franzo et al., 2014b) mentre il PCV2c è stato ritrovato solo in campioni storici danesi (Dupont et al., 2008).

Il commercio internazionale di suini ha dimostrato di svolgere un ruolo predominante nella disseminazione dei vari ceppi di PCV2, coinvolgendo sia Paesi sviluppati che in via di sviluppo e influenzandone potenzialmente l'evoluzione (Firth et al., 2009; Drew, 2011; Vidigal et al., 2012; Segales et al., 2013). Il settore suinicolo in Italia, forte di circa 9 milioni di animali mediamente allevati ogni anno (FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>), risulta di grande importanza economica; la vocazione alla produzione del suino pesante comporta maggiori problemi nella gestione e nel controllo delle patologie infettive, dovuti alla frequente compresenza di animali di età e fasi produttive diverse, con stato immunitario e sanitario differente. Inoltre, l'Italia è parte di un'estesa rete internazionale di scambi di animali vivi: nel solo 2013 sono stati infatti importati ed esportati rispettivamente 800000 e 15500 suini da e verso Paesi comunitari (<http://comtrade.un.org/data/> e <http://www.inea.it/banchedati>).

Questa situazione genera una combinazione di fattori favorevoli all'introduzione e la diffusione di virus, soprattutto quelli caratterizzati da eliminazione prolungata e che causano sintomatologia lieve o assente, come PCV2. Tuttavia non ci sono dati riguardanti la circolazione dei vari genotipi di PCV2 e della loro variabilità genetica nel panorama italiano. Il presente studio ha lo scopo di colmare queste lacune attraverso il sequenziamento dell'intero genoma di PCV2 da campioni raccolti in Italia a partire dal 2007. Ciò ha permesso di ottenere informazioni sulla distribuzione di PCV2 in Italia e sui potenziali legami epidemiologici con altri Paesi.

MATERIALI E METODI

Campioni ed estrazione del DNA

Novantasei campioni (polmoni, linfonodi e sieri), classificati positivi per PCV2 tramite immunoistochimica o real time-PCR, sono stati gentilmente forniti da laboratori diagnostici pubblici e privati. Tutti i campioni sono stati stoccati a -20°C fino all'estrazione del DNA. Prima

dell'estrazione, ciascun grammo di tessuto è stato omogenato meccanicamente in 5ml di PBS. Successivamente 200 μ L di omogenato o di siero sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA, eseguita utilizzando il DNeasy® Blood and Tissue kit (Quiagen).

PCR e sequenziamento

Il genoma completo di PCV2 è stato amplificato mediante 4 distinte PCR validate nel corso del presente studio. Diverse coppie di primer, concentrazioni dei reagenti e protocolli termici sono stati valutati e successivamente validati al fine di ottenere la maggior resa in assenza di amplificati aspecifici. Gli amplificati ottenuti, previa purificazione, sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando i medesimi primer impiegati durante la PCR. La qualità dei cromatogrammi ottenuti è stata preliminarmente valutata tramite FinchTV (<http://www.geospiza.com>) e quindi le sequenze consenso sono state assemblate utilizzando CromasPro (CromasPro Version 1.5).

Analisi delle sequenze

Le sequenze dei genomi completi ottenuti nel presente studio sono state allineate con il metodo MUSCLE implementato in MEGA6. La presenza e le caratteristiche di eventuali fenomeni di ricombinazione sono state studiate tramite il programma RDP4. Le sequenze non ricombinanti del gene ORF2 dei ceppi italiani sono state genotipizzate confrontandole con il database di riferimento fornito da Franzo et al., (2014b); le relazioni filogenetiche fra le sequenze sono state ricostruite utilizzando sia un approccio di tipo Bayesiano che di Neighbour Joining, implementati rispettivamente nei software MrBayes e MEGA6. Quest'ultimo software è stato utilizzato, limitatamente agli stipiti italiani, anche per calcolare la distanza fra le singole coppie di sequenze, nonché la distanza genetica media *intra-* e *inter-*genotipo. Le relazioni epidemiologiche fra l'Italia e altri Paesi sono state esaminate confrontando le sequenze ottenute nel presente studio con quelle depositate in GenBank. A tal fine è stato scaricato un numero rappresentativo di sequenze del gene ORF2 per le quali fossero disponibili informazioni sul Paese di origine del campione, ottenendo complessivamente 97 sequenze di PCV2a, 381 di PCV2b e 166 di PCV2d. Queste sono state allineate con le rispettive sequenze italiane e, a partire dai database così ottenuti, sono stati ricostruiti degli "*haplotype network*" specifici per ciascun genotipo utilizzando il metodo Median Joining implementato in Network4.6.1.2. Un analogo approccio analitico è stato usato per studiare lo scenario e le relazioni epidemiologiche, fra le province Italiane.

RISULTATI

Caratterizzazione genetica di PCV2 in Italia

Complessivamente, sono stati ottenuti 75 genomi completi di stipiti di PCV2 campionati in 39 allevamenti dislocati in 11 province del Nord Italia nel periodo 2007-2014. Sulla base delle sequenze del gene ORF2, 3, 56 e 8 stipiti sono stati classificati come appartenenti rispettivamente ai genotipi PCV2a, PCV2b e PCV2d. Il genotipo PCV2b è stato nettamente il più prevalente per l'intera durata dello studio, mentre il genotipo PCV2a è stato riscontrato solo sporadicamente fra il 2008 e il 2012. PCV2d, identificato per la prima volta nel 2010, è risultato presente nel nostro territorio sino al 2014.

Dieci stipiti virali sono stati identificati come ricombinanti, riconducibili a 6 eventi di ricombinazione indipendenti. Tutti i genotipi sono risultati implicati negli eventi di ricombinazione, sebbene, con maggior frequenza, i genotipi PCV2b e PCV2d siano emersi come genotipi parentali (i.e. 4 eventi di ricombinazione su 6). Tutte le sequenze derivanti dal medesimo evento di ricombinazione sono state campionate in un ristretto arco spazio-temporale. Le sequenze italiane, sia considerando il genoma completo sia la sola ORF2, dimostrano una rilevante distanza genetica (i.e. range = 0-5,6% e 0-11% rispettivamente), specchio della circolazione di diversi genotipi nel nostro territorio. Tuttavia, anche all'interno dei singoli genotipi, la distanza genetica è rilevante e in particolare PCV2a è risultato essere caratterizzato dalla maggior distanza nucleotidica. Considerevole,

sebbene inferiore, risulta essere la variabilità genetica dei genotipi PCV2b e PCV2d. Risultati analoghi sono stati ottenuti valutando la distanza amminoacidica calcolata sulla proteina capsidica.

Distribuzione geografica di PCV2 e commerci internazionali

I network filogenetici basati sul Median Joining, rispetto ai più tradizionali alberi filogenetici, permettono di rappresentare simultaneamente i possibili alberi più parsimoniosi e di esprimere graficamente la frequenza dei diversi aplotipi in modo facilmente comprensibile. Queste caratteristiche, assieme alla possibilità di associare a ciascuna sequenza un dato carattere (e.g. luogo di origine), hanno permesso una rappresentazione intuitiva della struttura geografica di PCV2 e della sua diffusione.

Complessivamente, il quadro italiano è risultato essere assai complicato. PCV2a ha rivelato una stretta associazione fra la provincia di campionamento e l'aplotipo riscontrato. Anche PCV2d, identificato solamente in tre province, ha rivelato una tendenza dei ceppi filogeneticamente vicini ad interessare il medesimo areale. Completamente diversa è risultata invece la distribuzione di PCV2b, caratterizzata dalla presenza di diversi aplotipi nella medesima provincia e dal riscontro del medesimo aplotipo in province diverse (Fig.1). Anche in questo caso gli stipti identici o fortemente correlati condividevano spesso la medesima provincia di origine. Dalla valutazione delle relazioni con ceppi campionati in altri Paesi è emerso che le sequenze di PCV2a italiane sono risultate far parte di due cluster comprendenti rispettivamente sequenze di origine europea e asiatica (Fig.2a). Una percentuale consistente degli stipti italiani di PCV2b (34%) è risultata far parte di tre aplotipi presentanti un'ampia distribuzione a livello mondiale (Europa, Asia e Sud America). Degli aplotipi identificati solamente in Italia, quattro sono risultati filogeneticamente vicini ad altri aplotipi includenti sequenze italiane. Tuttavia, altri due aplotipi specificamente italiani non presentavano relazioni dirette con altre sequenze campionate in Italia (Fig.2b). Tutti gli stipti italiani di PCV2d sono risultati identici o quantomeno altamente simili ad aplotipi comprendenti solamente o per la stragrande maggioranza stipti asiatici (in particolare di origine cinese) (Fig.2c).

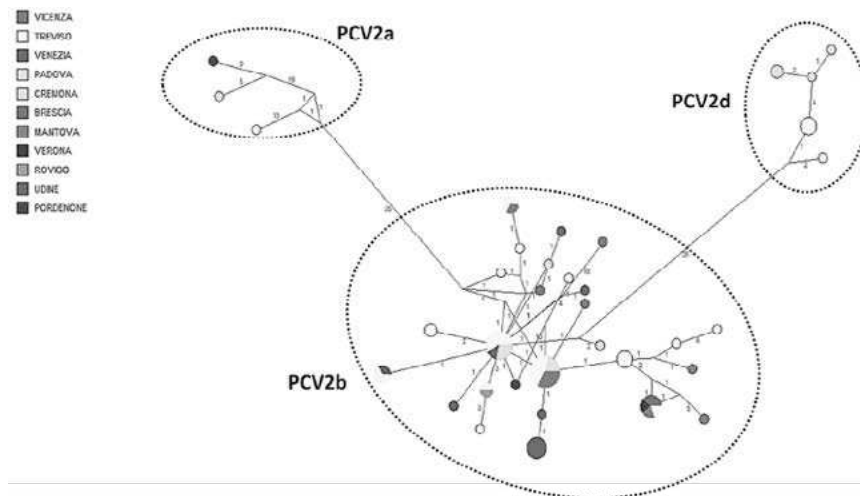


Figura 1. Haplotype network di PCV2. - Median-joining (MJ) network di tutti gli aplotipi di PCV2 italiani costruiti utilizzando il programma Network 4.6.1.20. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo, mentre il numero di mutazioni

tra aplotipi è riportato vicino ai rami. Le province in cui sono stati raccolti i campioni sono rappresentate come un grafico a torta colorata con fette proporzionali alla frequenza della provincia.

Figure 1. Haplotype network of PCV2. Median-joining (MJ) network of all Italian PCV2 haplotypes built using the Network 4.6.1.20 program. The size of the circumferences is proportional to the haplotype frequencies, while the number of mutations between haplotypes is reported near the branches. Provinces where samples were collected are represented as a color-coded pie chart with slices proportioned to provinces' frequency.

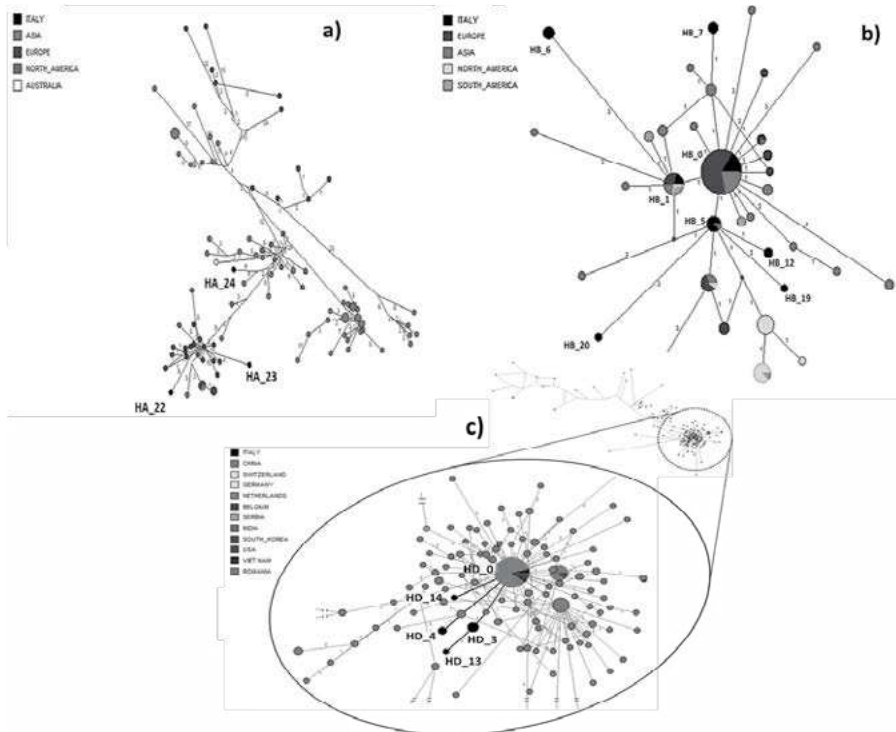


Figura 2. Median-joining (MJ) network di PCV2a (a), PCV2b (b) and PCV2d (c). Gli aplotipi sono raggruppati in base alla classificazione del genotipo. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alle frequenze dell'aplotipo mentre il numero di mutazioni tra aplotipi è riportato vicino ai rami. Gli aplotipi sono colorati in base ai continenti dove sono stati raccolti i campioni mentre i campioni italiani sono colorati in nero.

Figure 2. Median-joining (MJ) network of PCV2a (a), PCV2b (b) and PCV2d (c). The haplotypes are grouped according to genotype classification. The size of the circumferences is proportional to the haplotype frequencies while the number of mutations between haplotypes is reported near the branches. Haplotypes are color coded according to the continents where samples were collected while Italian samples are colored in black.

DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di fornire una prima panoramica

dell'epidemiologia molecolare dei ceppi di PCV2 circolanti in Italia, analizzando la presenza dei diversi genotipi e la loro eterogeneità.

Tutti i genotipi finora riconosciuti sono stati identificati anche in Italia, con la sola eccezione di PCV2c. La ripartizione dei genotipi è caratterizzata dalla netta predominanza di PCV2b, in accordo con quanto evidenziato in altri Paesi, dove numerosi autori hanno accertato uno shift genotipico da PCV2a a PCV2b a partire dal 2003 (Grau-Roma et al., 2011; Segales et al., 2013). Infatti, la presenza di alcuni ceppi PCV2a lontanamente correlati permette di ipotizzare un'analoga perdita di rilevanza di questo genotipo nel nostro Paese. Per contro, la ridotta finestra temporale esplorata dal nostro studio, congiuntamente all'assenza di dati pregressi sull'epidemiologia italiana di PCV2, non ha permesso di confermare l'avvenimento dello shift genotipico anche in Italia e di verificare l'andamento delle relazioni tra i genotipi. Stipiti di PCV2d, simili a quelli descritti in questo studio, sono stati campionati per la prima volta in Cina nel 2007 (Guo et al., 2010), circa 3 anni prima del riscontro italiano.

In questo studio è stata inoltre evidenziata la presenza di frequenti eventi di ricombinazione, caratteristica già ben accertata per i virus a singolo filamento di DNA (Lefevre et al., 2009) e per PCV2 in particolare (Hesse et al., 2008; Huang et al., 2013; Franzo et al., 2014b). Sicuramente, l'elevata frequenza di ricombinazione tra tutti i genotipi rilevati in Italia suggerisce una parimenti elevata frequenza di coinfezione, come già dimostrato in un recente studio incentrato su PRRSV (Franzo et al., 2014a). La vasta circolazione dei patogeni, confermata anche da dati filogeografici, ha verosimilmente svolto un ruolo determinante nel fenomeno della ricombinazione, rendendo manifesti anche i reali limiti della biosicurezza e delle strategie di controllo.

Sebbene il ruolo biologico della ricombinazione necessiti di ulteriori approfondimenti, la sua importanza non va sottovalutata poiché può significativamente condizionare la genotipizzazione dei ceppi falsando i risultati di studi epidemiologici.

Valutazioni ulteriori hanno sottolineato che la profonda variabilità *intra*-genotipica non può essere giustificata solo dall'evoluzione virale ma che sia più probabilmente attribuibile a molteplici eventi di introduzione. Quest'ipotesi è inoltre supportata dalla topologia dell'albero filogenetico, in cui sequenze italiane sono parte di *clades* diverse.

La ricostruzione dei network filogenetici ha permesso di vagliare le relazioni tra gli stipiti raccolti in Italia e in altri Paesi. È da tenere in considerazione la difficoltà nello stabilire la precisa connessione tra Paesi a causa dell'elevata incertezza filogenetica, che determina interconnessioni multiple soprattutto tra stipiti con alta percentuale d'identità. Un *bias* dipendente dal campionamento non può essere escluso, a causa dei differenti metodi e attività di sequenziamento attuati dai vari Paesi e della diversa qualità dei metadati disponibili tra le sequenze depositate. Ciononostante, le informazioni esistenti hanno ugualmente permesso di delineare una panoramica adeguata dell'epidemiologia di PCV2 in Italia, dei pattern di introduzione e di conseguente diffusione. Con elevata probabilità, tutti i genotipi sono stati oggetto di eventi introduttivi. Il genotipo 2a è stato importato con eventi separati, probabilmente da Asia ed Europa (Fig.2a) e, di conseguenza, l'elevata variabilità italiana ne rispecchia l'eterogeneità nel mondo. Il riscontro di virus differenti e lontanamente correlati, in province italiane diverse, si può attribuire al calo della prevalenza e della circolazione di questo genotipo, risultante nel progressivo isolamento geografico degli stipiti. Al momento PCV2b è il genotipo prevalente e sono stati identificati numerosi aplotipi (Vidigal et al., 2012 e il presente studio), però solo 11 sono stati riscontrati in più di un Paese. Diciannove stipiti italiani di PCV2b (33,92%) appartengono a 3 di questi aplotipi, raccolti principalmente in Europa, Asia e Sud America. Nonostante l'elevata affinità tra gli aplotipi italiani di PCV2 possa suggerire una progressiva evoluzione dall'iniziale evento introduttivo, la presenza

dello stesso aplotipo in Paesi lontani contrasta questa stessa ipotesi (Fig.2b). La comparsa della medesima mutazione in regioni e momenti diversi è poco plausibile; un approccio più “parsimonioso” proporrrebbe un singolo evento mutazionale seguito dalla diffusione nei vari Paesi, Italia compresa, attraverso il commercio internazionale. Infatti, sequenze appartenenti allo stesso aplotipo sono state campionate principalmente in Paesi con cui l’Italia intrattiene rapporti commerciali, sia di import (Danimarca, Francia e Paesi Bassi) sia di export (Paesi dell’est Europa) di animali vivi (<http://comtrade.un.org/data/> accessed 25/08/2014). L’impatto delle esportazioni italiane sulla disseminazione virale è stato approfondito in un precedente studio con la dimostrazione dell’origine italiana di alcune sequenze slovene di PRRSV (Drigo et al., 2014). Allo stesso modo, il confronto tra sequenze italiane di PCV2 con una raccolta di sequenze parziali di ORF2 slovene conferma la stretta relazione tra virus campionati ai due lati del confine italo-sloveno. Nell’insieme, questi dati mettono in evidenza una situazione caratterizzata da un’ampia rete di connessioni commerciali ed epidemiologiche che ha facilitato l’introduzione da altri Paesi di vari stiptipi, i quali si sono poi affermati, aumentando in prevalenza ed evolvendo rapidamente. Un’analoga eterogeneità è stata dimostrata entro i confini italiani dalla presenza di aplotipi diversi nella stessa provincia e dello stesso aplotipo in province diverse; ciò rispecchia la fitta circolazione di PCV2 in Italia, ulteriore elemento di sovrapposizione con PRRSV (Franzo et al., 2014a), supportando come la co-circolazione di questi virus sia garantita dalle comuni vie di trasmissione e connessioni epidemiologiche. PCV2d è il genotipo di più recente introduzione in Italia ed è stato ritrovato principalmente in Asia (Ge et al., 2012), per quanto sia stato documentato anche in Europa e USA (Fig.2c). Come per PCV2b, la ristretta diversità genetica e l’elevato numero di reticolazioni ostacolano la ricerca di una precisa origine delle sequenze italiane. Ad ogni modo, gli stiptipi italiani sembrano originare da aplotipi identificati preminentemente in Cina, come potenziali risultati di eventi introduttivi separati. La distribuzione geografica di PCV2d è, almeno in Italia, più semplice di quella di PCV2b, con la diffusione di ciascun aplotipo limitata a una sola provincia, anche se la stessa provincia ospita aplotipi differenti (Padova e Treviso). Curiosamente, non sono permessi scambi commerciali di suini vivi tra Italia e Cina e la Cina è essenzialmente un paese importatore dall’Europa (Vidigal et al., 2012 e <http://comtrade.un.org/data/> accessed 25/08/2014). La potenziale via di introduzione di PCV2 dalla Cina resta quindi ignota e non è possibile escludere altre fonti di disseminazione. Una sottostima della circolazione di PCV2 in Europa può essere peraltro imputabile alla scarsa attività di sequenziamento. In conclusione, questo articolo racchiude la prima descrizione del panorama italiano in relazione a PCV2 e dimostra come la variabilità dei ceppi italiani sia dovuta a molteplici eventi introduttivi e alla rapida evoluzione virale. L’importazione di aplotipi stranieri, provenienti dall’Europa ma potenzialmente anche dall’Asia, ne ha permesso l’introduzione in regioni e momenti diversi e la successiva disseminazione entro i confini nazionali, cui è seguita una rapida evoluzione come conseguenza dell’elevato tasso mutazionale (Firth et al., 2009) e dei fenomeni di ricombinazione. Questo studio rimarca i limiti delle attuali strategie di biosicurezza perpetrate in Italia e rivolte al contenimento dell’infezione da PCV2.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Drew, T.W., 2011. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Rev. Sci. Tech.* 30, 95-106.

- Drigo, M., Franzo, G., Gigli, A., Martini, M., Mondin, A., Gracieux, P., Ceglie, L., 2014. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J. Virol. Methods* 202, 79-86.
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, 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.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813-12821.
- Franzo, G., Cecchinato, M., Martini, M., Ceglie, L., Gigli, A., Drigo, M., 2014a. Observation of high recombination occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in field condition. *Virus Res.* 194, 159-166.
- Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., Castro, A., Biaginni, P., Segalés, J., Drigo, M., 2014b. Revisiting the Taxonomical classification of PCV2: still a real challenge. *J. Virol.* (submitted).
- Ge, X., Wang, F., Guo, X., Yang, H., 2012. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. *Virus Res.* 164, 100-106.
- Grau-Roma, L., Fraile, L., Segales, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23-32.
- Guo, L.J., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Huang, L.P., Liu, C.M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol. J.* 7, 273-422X-7-273.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res.* 132, 201-207.
- Huang, Y., Shao, M., Xu, X., Zhang, X., Du, Q., Zhao, X., Zhang, W., Lyu, Y., Tong, D., 2013. Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus Res.* 175, 78-86.
- Lefevre, P., Lett, J.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J. Virol.* 83, 2697-2707.
- Lv, Q.Z., Guo, K.K., Zhang, Y.M., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes* 49, 1-10.
- Segales, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10-19.
- Segales, 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.
- Vidigal, P.M., Mafra, C.L., Silva, F.M., Fietto, J.L., Silva Junior, A., Almeida, M.R., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res.* 163, 320-327.