

CIRCOLAZIONE DI PCV2 IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA: VERSO UN NUOVO SHIFT GENETICO?

BARBIERI I.^[1], FACCINI S.^[2], BONIOTTI M.B.^[1], ALBORALI G.L.^[3],
ROSIGNOLI C.^[2], FRANZINI G.^[2], NIGRELLI A.^[2]

^[1]IZSLER Reparto Genomica ~ Brescia ~ Italy,

^[2]IZSLER Sez. Mantova ~ Mantova ~ Italy, ^[3]IZSLER Sez. Brescia ~ Brescia ~ Italy

Keywords: PCV2, genotype, genetic shift

Riassunto

Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un importante agente patogeno responsabile di diverse sindromi nei suini collettivamente denominate malattie da PCV (PCVD). Sulla base della sequenza di ORF2, i ceppi di PCV2 sono attualmente classificati in quattro genotipi: PCV2a, PCV2b, PCV2c e PCV2d. Quest'ultimo è considerato "emergente", essendo sempre più frequentemente isolato a livello mondiale, facendo ipotizzare un imminente shift genetico tra PCV2b e PCV2d. Lo studio riporta i risultati di una attività di monitoraggio di due anni sui ceppi di PCV2 circolanti in allevamenti suini prevalentemente del nord d'Italia. Sono stati effettuati 79 sequenziamenti di ORF2 di ceppi da casi sospetti di PCVD da 58 allevamenti. PCV2b è risultato il genotipo prevalente, circolando nel 63.8% degli allevamenti, seguito dal genotipo PCV2d (29.3%) e PCV2a (6.8%). Un importante incremento del PCV2d si è riscontrato nel corso del 2015. Nel 2014 su 30 allevamenti di provenienza dei ceppi sequenziati, nell'86.7% era presente PCV2b e in uno solo si è riscontrato PCV2d (3.33%). Nel 2015 invece, dei 28 allevamenti campionati il 37,9% aveva PCV2b e il 55,2% PCV2d. I dati rafforzano l'ipotesi di PCV2d come genotipo emergente e di uno shift genetico imminente o addirittura in corso tra PCV2b e PCV2d. In questo contesto sostenere i dati diagnostici con l'analisi di sequenza è estremamente importante.

Abstract

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is an important pathogen related to several disease syndromes in pigs collectively named PCV diseases (PCVD). Based on ORF2 sequences, PCV2 strains are currently classified into four genotypes: PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCV2d. The latter is considered an emergent genotype as it has been increasingly isolated worldwide. In this work we report a two-year monitoring activity on PCV2 in swine farms located in the North of Italy. Seventy-nine sequences have been obtained from cases of suspect PCVD. PCV2b is the most widespread genotype: it has been detected in 63.8% of farms, followed by PCV2d (29.3%) and PCV2a (6.8%). A considerable increase in PCV2d frequency was registered during 2015. Indeed in 2014 PCV2b was present in 86.7% of 30 herds and PCV2d circulated in only one (3.33%). On the contrary, in 2015 in 37,9% of the herds were infected by PCV2b, and 55,2% by PCV2d. Data strengthen the hypothesis of PCV2d as an emergent genotype and of an imminent or even ongoing genetic shift between PCV2b and PCV2d. In this context sustaining diagnostic data with sequence analysis is extremely important.

INTRODUZIONE:

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) appartiene alla famiglia Circoviridae, genere Circovirus. PCV2 è ampiamente diffuso nella popolazione suina mondiale. Le infezioni causate

da questo virus possono essere subcliniche o associate a differenti patologie collettivamente definite PCV diseases (PCVD) ovvero malattie da PCV (30). Tra le manifestazioni cliniche più comunemente associate all'infezione vi sono la malattia sistemica da PCV2 (PCV-SD, precedentemente denominata PMWS), disturbi respiratori, disordini riproduttivi, forme enteriche, sindrome dermatite nefrite (PDNS). Se l'infezione da PCV2 è un requisito per l'insorgere di PCVD altri co-fattori sono necessari per scatenare e indurre la forma clinica della malattia (5; 31). Tra le cause scatenanti note vi sono la presenza di agenti co-infettanti quali Parvovirus, PRRSV, Mycoplasma hyopneumoniae, l'immuno stimolazione (2; 20)(1; 25), particolari stress o cattive pratiche di allevamento (5; 31). E' comunque ampiamente dimostrato che i titoli virali di PCV2 presenti nei tessuti e nei sieri degli animali affetti dalla forma clinica della malattia sono correlati alla gravità della sintomatologia e alle lesioni istopatologiche tipiche, quali la deplezione linfocitaria e l'infiammazione granulomatosa (11; 23; 32; 34). Ne consegue che, se la PCR qualitativa non è di grande utilità ai fini diagnostici, la Real-Time PCR quantitativa (qPCR) può essere di grande supporto soprattutto nella diagnosi ante mortem. Purtroppo però la scarsa riproducibilità delle quantificazioni virali ottenute mediante qPCR in laboratori diversi (13; 16) e l'applicazione di metodiche differenti, rendono difficoltoso stabilire dei cut-off univoci da utilizzare per la diagnosi di PCVD (12; 14; 23; 32). La presenza di titoli virali molto elevati, $>10^8$ copie genoma/g tessuto o $>10^6$ copie genoma/mL siero o fluido orale, possono comunque essere considerati, una forte indicazione diagnostica di PCVD (34). Il genoma di PCV2 è costituito da una molecola di DNA circolare a singolo filamento di 1,766–1,768 nucleotidi (nt) in cui sono presenti 4 principali open reading frames (ORFs). Sulla base della variabilità genetica di ORF2, che codifica per la proteina capsidica virale, sono stati fino ad ora individuati 4 genotipi: PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d (3; 9; 33; 41), ma nuove varianti vengono continuamente segnalate (15). Il genotipo PCV2a era il più comune fino al 2003, in seguito a quello che viene definito uno shift genetico, è successivamente stato soppiantato dal genotipo PCV2b (22). PCV2c era stato individuato in campioni danesi raccolti tra il 1980 e il 1990 e solo recentemente è stato osservato nel Pantanal in Brasile (7). PCV2d è molto simile a PCV2b. La caratteristica distintiva fondamentale è la presenza di un residuo di Lisina (K) addizionale nella proteina nucleocapsidica in posizione 234. PCV2d è stato descritto per la prima volta in Cina (37). Successivamente ceppi molto simili sono stati isolati in tutto il mondo (4; 10; 17; 27-29; 38; 40) spesso in associazione a casi di sospetto fallimento vaccinale, suscitando l'interesse della comunità scientifica. La vaccinazione, infatti, è la migliore ed efficace strategia di controllo di PCVD, in grado di ridurre drasticamente la mortalità, la gravità della sintomatologia e incrementare l'accrescimento dei suinetti. Tutti i vaccini commerciali contro PCV2 sono basati sul genotipo PCV2a. Ciononostante, i dati clinici e gli studi sperimentali provano indiscutibilmente la loro efficacia nel controllo delle infezioni da PCV2b e PCV2d (24). Nessun tipo di vaccino però conferisce un'immunità completa. I suini vaccinati infatti possono ancora essere infettati dal virus (19), che quindi continua a circolare negli allevamenti sottoposti a vaccinazione. Di conseguenza non può essere escluso che l'immunità derivante dalla vaccinazione eserciti una pressione selettiva che possa portare all'emergere di ceppi di PCV2 in grado di evadere la vaccinazione (18; 21). In considerazione di quanto appena descritto, vi è un crescente interesse all'analisi della variabilità genetica dei ceppi di PCV2 circolanti nei vari territori (7; 17; 18; 26; 29; 35; 39; 41). Scopo del presente lavoro è quello di studiare da un punto di vista molecolare i ceppi di PCV2 rilevati in casi di sospetta PCVD caratterizzati da elevati titoli virali, considerati compatibili con la forma clinica della malattia secondo la maggior parte degli studi (30).

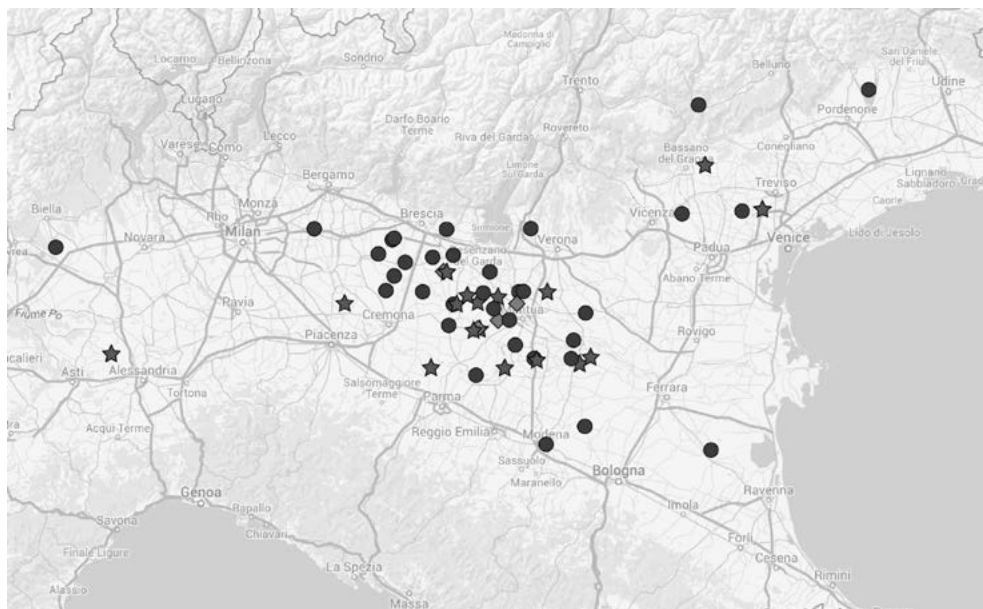
MATERIALI E METODI:

Tra gennaio 2014 e dicembre 2015, al fine di studiare i ceppi di PCV2 legati a episodi di sospetto PCVD negli allevamenti del Nord d'Italia, si è proceduto al sequenziamento di campioni con titoli virali $> 10e+ 8$ copie genoma/g tessuto o $> 10e+ 6$ copie genoma/mL siero o fluido orale, conferiti presso le sezioni di Mantova e Brescia, per diagnosi di PCVD. Gli acidi nucleici sono stati estratti con il sistema semiautomatico King-Fisher Flex utilizzando il kit One-for-all Vet Kit (Qiagen, USA) secondo le indicazioni del produttore. Il genoma di PCV2 è stato rilevato e quantificato con Real-Time PCR secondo quanto precedentemente descritto (6; 23). Le sequenze di ORF2 sono state ottenute utilizzando BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v1.1, (Life Technologies) con 3500xl genetic analyzer (Life Technologies) secondo il protocollo descritto in precedenza (29). Per 37 ceppi sono state anche rilevate le sequenze del genoma totale (29). Le sequenze sono state assemblate e allineate con quelle di riferimento per ciascun genotipo noto (PCV2a: AF055392; PCV2b: AF055394; PCV2c: EU148503; PCV2d: JX535297; PCV2 variante Messico/USA 2015: KT795287) utilizzando i moduli SeqMan and MegAlign del software Lasergene (DNASStar Inc., Madison, WI, USA). L'analisi filogenetica è stata condotta mediante metodo Maximum likelihood con il modello Kimura two-parameter utilizzando il software MEGA 6 (36).

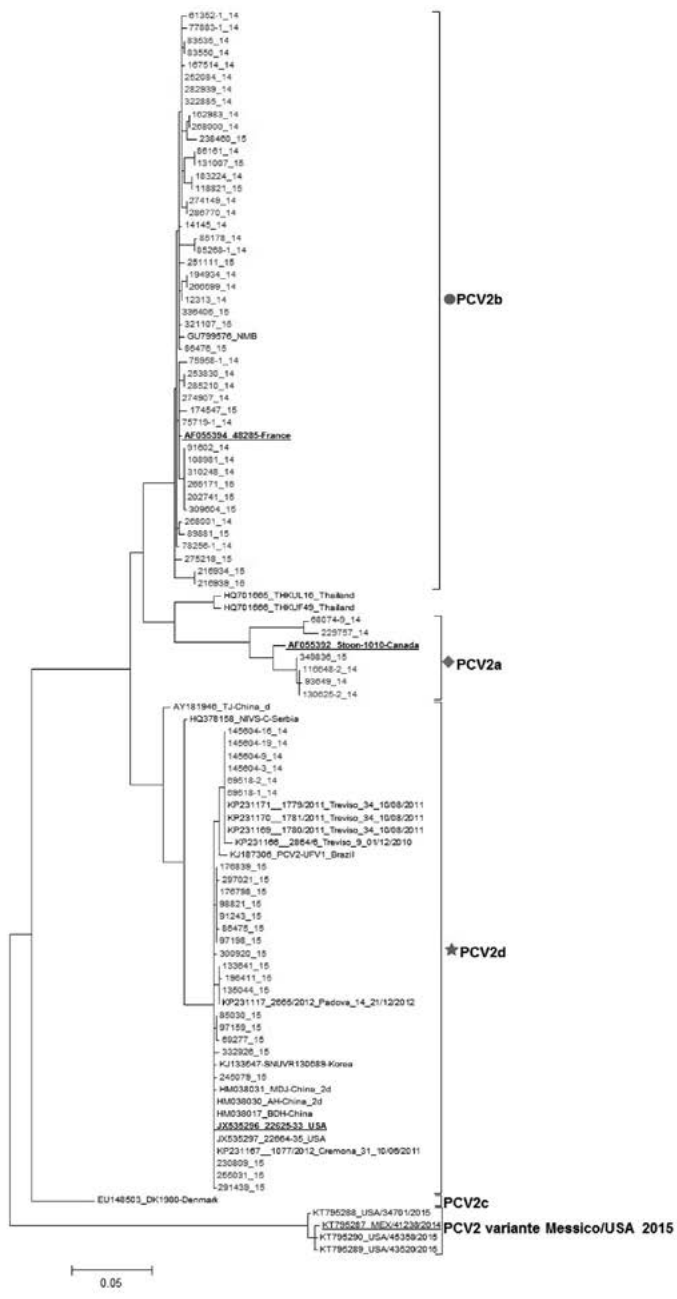
RISULTATI E DISCUSSIONE:

Tra gennaio 2014 e dicembre 2015 sono stati sequenziati 79 campioni, di cui: 11 seri, 62 tessuti, 2 fluidi orali, 4 feti, tutti con titoli virali $> 10e+ 8$ copie genoma/g tessuto o $> 10e+ 6$ copie genoma/mL siero o fluido orale, conferiti presso le sezioni di Mantova e Brescia per diagnosi di sospetta PCVD. I campioni provenivano da 58 allevamenti dislocati prevalentemente nella Pianura Padana (figura 1). L'analisi di sequenza e filogenetica hanno dimostrato la presenza nel territorio di tre genotipi: PCV2a, PCV2b e PCV2d (figura 2). Il PCV2c invece non è mai stato individuato così come le più recenti varianti Messico/USA del 2015 (15). Dal punto di vista molecolare i ceppi di genotipo emergente PCV2d identificati mostrano un'identità nucleotidica del 99-100% e una identità amminoacidica del 100% con i ceppi di riferimento del genotipo d (JX535297) e presentano il residuo di Lisina extra in posizione 234 caratteristico. Considerando i dati globali, il genotipo PCV2a è stato rilevato in 6 campioni (7.5 %) da 4 allevamenti (6.8%). Il genotipo PCV2b è risultato invece il prevalente: 44 sequenziamenti, infatti presentavano questo genotipo (55.7%), per un totale di 37 aziende di provenienza (63.8%). PCV2d, infine, è stato riscontrato in 26 campioni (32.9%) da 17 allevamenti (29.3%). In una azienda è risultato circolare in un primo momento il genotipo PCV2b e successivamente, a distanza di una decina di mesi, PCV2d. In due aziende invece si è riscontrata la concomitante circolazione b/d. I dati globali sono coerenti con il quadro delineato da una recente indagine condotta su campioni archiviati tra il 2002 ed il 2014 provenienti dalla stessa area geografica, che ha evidenziato la predominanza del genotipo PCV2b e la concomitante circolazione di PCV2a e PCV2d (8). E' però interessante osservare la distribuzione nel tempo dei genotipi rilevati nel presente studio. Nel 2014, infatti, sono state ottenute 41 sequenze di ceppi da 30 allevamenti. Nel 10% di queste circolava il genotipo PCV2a, nell'86.7% il PCV2b e in una soltanto (3.33%) il PCV2d. Al contrario, nel 2015, 35 sequenze sono state ottenute da 29 allevamenti e PCV2b circolava nel 37,93%, mentre nel 55.17% era presente PCV2d e solo un'azienda aveva il genotipo PCV2a (figura 3). Nonostante la presenza del genotipo PCV2d in Italia sia stata datata già a partire dal 2011 (Franzo et al., 2015b) i dati del presente lavoro suggeriscono che nel 2015 questo genotipo abbia iniziato predominare nella popolazione suina, almeno nel Nord Italia,

rafforzando l'ipotesi dell'esistenza di uno shift genetico in corso (41). La reale portata di tale fenomeno è, tuttavia, difficile da stabilire a causa del numero limitato di sequenze recenti disponibili per il territorio italiano. I protocolli di diagnosi di PCV2, infatti, raramente prevedono il sistematico il sequenziamento del genoma totale, o almeno della ORF2 dei ceppi. In conclusione lo studio conferma la crescente diffusione di PCV2d negli allevamenti italiani, rafforzando l'ipotesi di uno shift genetico in atto, simile a quello verificatosi tra il genotipo a e b (22). Una stretta sorveglianza epidemiologica che preveda l'affiancamento del sequenziamento alla diagnostica classica è estremamente importante in questa fase, sia per chiarire il possibile ruolo di eventuali fattori selettivi implicati in questo fenomeno, che per monitorare costantemente l'eventuale insorgenza di nuove varianti.



Siti di provenienza dei ceppi sequenziati. Ogni cerchio corrisponde a una azienda con PCV2b circolante, ogni rombo con PCV2a e ogni stella con PCV2d.



Albero filogenetico delle sequenze di ORF2 di ceppi di PCV2 ottenute nel 2014 e 2015. L'analisi è stata condotta mediante metodo Maximum Likelihood con il modello Kimura two-parameter. Le sequenze dei ceppi prototipo per ciascun genotipo noto (Pcv2a, PCV2b, PCV2c e PCV2d) e della nuova variante Messico/USA 2015 sono sottolineate. Nell'albero sono inclusi anche ceppi di riferimento dei vari genotipi reperibili in GenBank tra cui 6 sequenze italiane appartenenti al genotipo PCV2d precedentemente descritte (Franzo et al. 2015b)

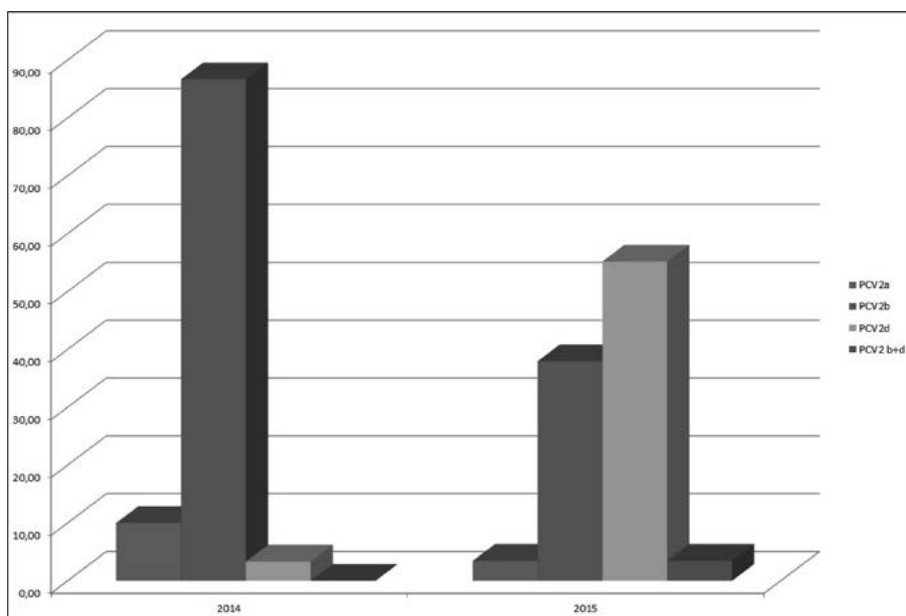


Grafico delle frequenze dei genotipi di PCV2 negli allevamenti considerati, distinte per anno

BIBLIOGRAFIA:

1. Allan, G., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., 2001. Neonatal vaccination for M hyopneumonia and PMWS: a field trial, *Pig J* 48, 1-15.
2. Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., 2000. Immunostimulation, PCV-2 and PMWS, *Vet Rec* 147 (6), 170-171.
3. Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segales, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature, *Vet Microbiol* 149, 522-523.
4. Eddicks, M., Fux, R., Szikora, F., Eddicks, L., Majzoub-Altweck, M., Hermanns, W., Sutter, G., Palzer, A., Banholzer, E., Ritzmann, M., 2015. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany, *Vet Microbiol* 176 (3-4), 337-343.
5. Ellis, J., 2014. Porcine Circovirus: A Historical Perspective, *Veterinary Pathology Online* 51 (2), 315-327.
6. Faccini, S., Nigrelli, A.D., Franzini, G., Rosignoli, C., Barbieri, I., Alborali, G.L., Boniotti, M.B., 2011. Effects of DNA extraction method on Porcine circovirus-2 real-time polymerase chain reaction quantification in swine lymph node samples, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (6), 1189-1196.
7. Franzo, G., Cortey, M., De Castro, A., Alessandra, M.M., Piovezan, U., Szabo, M., 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 (1-2), 158-162.
8. Franzo, G., Cortey, M., Castro, Alessandra Marnie Martins Gomes 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 (1-2), 158-162.
9. Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., De Castro, A., Biagini, P., Segales, J., Drigo, M., 2015. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2):

still a real challenge, *Virology Journal* 12 (1), 131.

10. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., Drigo, M., 2015. International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy, *Infection, Genetics and Evolution* 32 (0), 409-415.

11. 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 (1), 23-32.

12. Grau-Roma, L., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L.E., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark, *Vet Microbiol* 135 (3-4), 272-282.

13. Harding, J.C., Baker, C., Rhodes, C., McIntosh, K.A., Bonneau, M., 2009. Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories, *Can J Vet Res* 73 (1), 7-14.

14. 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 Invest* 20 (3), 274-282.

15. Harmon, K.M., Gauger, P.C., Zhang, J., Pineyro, P.E., Dunn, D.D., Chriswell, A.J., 2015. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States, *Genome Announc* 3 (6), 10.1128/genomeA.01315-15.

16. Hjulsager, C.K., Grau-Roma, L., Sibila, M., Enøe, C., Larsen, L., Segalés, J., 2009. Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples, *Vet Microbiol* 133 (1-2), 172-178.

17. Huynh, T.M.L., Nguyen, B.H., Nguyen, V.G., Dang, H.A., Mai, T.N., Tran, T.H.G., Ngo, M.H., Le, V.T., Vu, T.N., Ta, T.K.C., Vo, V.H., Kim, H.K., Park, B.K., 2014. Phylogenetic and Phylogeographic Analyses of Porcine Circovirus Type 2 Among Pig Farms in Vietnam, *Transboundary and Emerging Diseases* 61 (6), e25-e34.

18. Kekarainen, T., Gonzalez, A., Llorens, A., Segales, J., 2014. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms, *J Gen Virol* 95 (Pt 8), 1734-1742.

19. Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segales, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2, *Vet Immunol Immunopathol* 136 (3-4), 185-193.

20. Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the Immune System is the Pivotal Event in the Production of Wasting Disease in Pigs Infected with Porcine Circovirus-2 (PCV-2), *Veterinary Pathology Online* 38 (1), 31-42.

21. Lv, Q.Z., Guo, K.K., Zhang, Y.M., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2, *Virus Genes* 49 (1), 1-10.

22. Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality, *Virology* 357, 175-185.

23. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, 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 (1), 75-80.

24. Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Mogler, M., Halbur, P.G., 2014. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain, *Vaccine* 32 (2), 230-237.

25. Opriessnig, T., Yu, S., Gallup, J.M., Evans, R.B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E.L., Brockus, C.W., Ackermann, M.R., Thomas, P., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus, *Vet Pathol* 40, 521-529.
26. Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2013. Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination, *Infection, Genetics and Evolution* 19 (0), 23-31.
27. Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2015. First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay, *Infection, Genetics and Evolution* 33 (0), 320-323.
28. Salgado, R.L., Vidigal, P.M., de Souza, L.F., Onofre, T.S., Gonzaga, N.F., Eller, M.R., Bressan, G.C., Fietto, J.L., Almeida, M.R., Silva Junior, A., 2014. Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak, *Genome Announc* 2 (2), 10.1128/genomeA.00163-14.
29. Savic, B., Milicevic, V., Jakic-Dimic, D., Bojkovski, J., Prodanovic, R., Kureljusic, B., Potkonjak, A., Savic, B., 2012. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia, *Arch Virol* 157 (1), 21-28.
30. Segales, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res* 164 (1-2), 10-19.
31. Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev* 6 (2), 119-142.
32. Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M., 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Microbiol* 111 (3-4), 223-229.
33. Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature, *Vet Rec* 162, 867-868.
34. Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res* 164 (1-2), 10-19.
35. 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.
36. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol* 30 (12), 2725-2729.
37. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, *Virus Res* 145, 151-156.
38. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, *Virus Res* 145 (1), 151-156.
39. Wei, C., Zhang, M., Chen, Y., Xie, J., Huang, Z., Zhu, W., Xu, T., Cao, Z., Zhou, P., Su, S., Zhang, G., 2013. Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012, *Infect Genet Evol* 17, 87-92.
40. 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 (22), 12469-12.
41. Xiao, C., 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, *Journal of General Virology*.