

# Principali malattie associate all'infezione da Circovirus suino tipo 2 (PCV2)



S. PETRINI<sup>1</sup>, M. PANICCIÀ<sup>1</sup>, S. GAVAUDAN<sup>1</sup>, E. SIMONI<sup>1</sup>, M. SENSI<sup>1</sup>, G. FILIPPONI<sup>3</sup>, L. RIGOTTI<sup>4</sup>, M. FORTUNATI<sup>1</sup>, M. FERRARI<sup>2</sup>, G.M. DE MIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Via Gaetano Salvemini, 1  
06126 Perugia, Italia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Via A. Bianchi, 7/9  
25124 Brescia, Italia

<sup>3</sup> Azienda Unica Sanitaria Regionale, Zona Territoriale 11, Fermo, Italia

<sup>4</sup> Veterinario Libero Professionista

## RIASSUNTO

Ad oggi l'infezione da PCV2 è stata rilevata in tutto il mondo nei suini domestici e selvatici ed è stata associata a diverse sindromi, che sono state collettivamente chiamate malattie associate al circovirus (PCVD). Tra queste, vengono comprese: la sindrome multisistemica post-svezzamento del suino (PMWS), la dermatite-nefrite del suino (PDNS) e in alcuni casi il complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC). Ad oggi la PMWS è considerata quella che ha il maggior impatto economico sull'industria suinicola e il principale segno clinico della stessa è rappresentato dal deperimento accertato negli animali tra le 5 e le 12 settimane di vita. La diagnosi di questa sindrome viene effettuata in presenza di lesioni istopatologiche tipiche nei tessuti linfoidi associate alla contemporanea presenza del PCV2 negli stessi organi. La PMWS è considerata una sindrome a eziologia multifattoriale dove oltre al PCV2, sono necessari altri fattori per determinare i segni clinici. Diversamente, la PDNS è una malattia dove si accertano immuno-complessi, glomerulonefrite fibro-necrotica e vasculiti necrotiche. Queste lesioni sono associate al PCV2, ma ad oggi non è stato ancora dimostrato il ruolo patogenetico del virus nello sviluppo delle lesioni precedentemente menzionate. Il PCV2 è stato inoltre rilevato in alcuni casi a livello polmonare e questo ha suggerito ad alcuni Autori che il virus potrebbe essere un importante agente di sviluppo della Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) in presenza di una bassa prevalenza di altri patogeni virali e/o batterici. Attualmente la PRDC, si evidenzia con una sintomatologia molto variabile e aspecifica.

Per la profilassi indiretta, in Europa i vaccini commercializzati sono attualmente tre. Di questi, due sono registrati per l'impiego solo sui suinetti, mentre uno è attualmente autorizzato per la somministrazione sia su scrofe sia sui suinetti.

## PAROLE CHIAVE

PCV2, eziologia, sintomatologia, diagnosi, controllo.

## INTRODUZIONE

Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è stato isolato in Canada nel 1991<sup>1,2</sup> in corso di sindrome multisistemica post-svezzamento (PMWS) e la stessa è stata accertata poi in Asia, America ed Europa<sup>3-18</sup>. Negli anni successivi il PCV2 è stato inoltre associato ad ulteriori sindromi del suino.

La PMWS è la patologia più studiata fino ad oggi, nell'ambito delle malattie associate al circovirus suino (PCVD) ed è considerata la più significativa in quanto gli studi e le ricerche eseguite negli ultimi anni sono stati concentrati su di essa. Le PCVD hanno un notevole impatto economico sulle aziende suinicole di tutto il mondo. Stime eseguite tra il 2000 e il 2003 hanno evidenziato che la sola PMWS ha causato agli allevatori di suini appartenenti all'Unione Europea oltre 600 milioni di Euro all'anno di perdite economiche<sup>19</sup>.

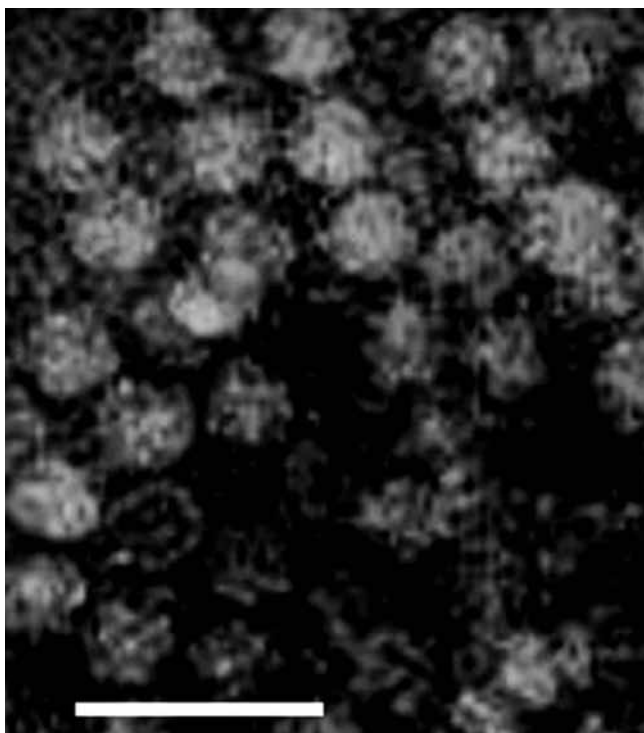
Il rilievo del virus negli allevamenti suini è causa necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo delle PCVD, poiché il vi-

rus è ubiquitario<sup>20,21</sup> e si può accertare anche negli allevamenti in cui non sono mai state segnalate forme patologiche. Il quadro clinico dei suini con infezione da PCV2 è influenzato da fattori che comprendono il management aziendale, le strategie di controllo delle co-infezioni, la predisposizione di razza, l'alimentazione e gli schemi vaccinali impiegati. Ne scaturisce quindi che il PCV2 si riscontra in associazione ad una elevata prevalenza di aziende e animali infetti, diversamente dalle PCVD che sono relativamente sporadiche. Scopo del presente lavoro è stato quello di redigere una *review* riguardante l'epidemiologia, la sintomatologia e la diagnosi delle principali malattie associate al Circovirus suino tipo 2, oltre al controllo delle stesse patologie.

## EZIOLOGIA

PCV2 appartiene alla Famiglia *Circoviridae* genere *Circovirus*. Il genoma virale consiste in un unico filamento circolare di DNA composto da sei tratti genomici denominati "open reading frames" (ORFs)<sup>22</sup>. ORF1 (*cap*) codifica per diverse proteine essenziali per la duplicazione del DNA, mentre ORF2 (*rep*)

Autore per la corrispondenza:  
Stefano Petrini (s.petrini@izsum.it).



**Foto 1** - Fotografia al microscopio elettronico di particelle virali<sup>1</sup> a simmetria icosaedrica da surnatante di colture cellulari di rene neonatale di suino (NSK) infettate con lo stipite PCV2 (07/64181 L). Colorazione negativa. Linea 50 nm.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

codifica per le principali proteine strutturali<sup>23,24</sup>. Si ipotizza che ORF3 sia responsabile dell'apoptosi cellulare<sup>25,26</sup>, mentre il ruolo svolto dagli altri ORFs non è a tutt'oggi conosciuto. I dati ottenuti dalla caratterizzazione genomica condotta sulla sequenza ORF2 hanno evidenziato la presenza di 3 geno-gruppi: PCV2a, PCV2b e PCV2c. Gli stipiti virali più diffusi sono rappresentati da PCV2a e PCV2b a differenza del PCV2c rilevato solo in Spagna<sup>27</sup>. Inoltre, il PCV2b è il genotipo associato ai più gravi focolai di PMWS avvenuti dopo il 2003.

I virioni con capsidi delle dimensioni di  $17 \pm 1,3$  nm di diametro<sup>28</sup> hanno simmetria icosaedrica (Foto 1), non possiedono envelope ed hanno una densità in cloruro di cesio (CsCl) da 1,33 a 1,37 g/cm<sup>3</sup>. L'assenza dell'envelope determina una resistenza ai disinfettanti che contengono alcool, clorexidina, iodio e fenolo<sup>29</sup>. È per questo motivo che il PCV2 può essere inattivato da disinfettanti alcalini (idrossido di sodio), agenti ossidanti (ipoclorito di sodio) e sali quaternari d'ammonio<sup>30</sup>. Inoltre, il virus può essere inattivato da trattamenti termici eseguiti alla temperatura di 70°C per 15 minuti<sup>31</sup>.

Il Circovirus suino tipo 2 coltiva su colture cellulari allestite da rene, polmone, fegato, milza, intestino, testicolo e linfonodi di suino. In tutti i casi la replicazione del virus non è associata alla comparsa di effetto citopatico e l'identificazione virale viene eseguita con prove di immunofluorescenza dopo un periodo minimo di 96 ore dall'infezione dei substrati cellulari sia nel citoplasma che nel nucleo delle cellule infette, con particolare riferimento alla membrana perinucleare. Dopo lo stesso periodo, previa colorazione con ematossilina-eosina, è possibile apprezzare le caratteristiche alterazioni cellulari, gli inclusi intracitoplasmatici, che di solito si presentano di forma ovalare e separati da un alone chiaro<sup>32-34</sup>.

## MALATTIE ASSOCIATE ALL'INFEZIONE DA PCV2

Il PCV2 è associato a diverse malattie complessivamente definite Porcine Circovirus Diseases (PCVD) in Europa<sup>20</sup> e Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVAD) in nord America<sup>35</sup>. Ad oggi sono comprese nelle terminologie PCVD/PCVAD la sindrome multisistemica post-svezzamento del suino (PMWS)<sup>3-18</sup>, la dermatite e nefrite del suino (PDNS)<sup>36,37</sup>, i disordini riproduttivi<sup>38</sup>, le enteriti<sup>39,40</sup> e la polmonite necrotizzante e proliferativa<sup>41,42</sup>. In alcuni casi inoltre, l'infezione è associata al complesso delle malattie respiratorie<sup>43,44</sup> del suino (PRDC).

## EPIDEMIOLOGIA

Il suino è stato sempre considerato l'unico ospite naturalmente recettivo all'infezione. Studi sperimentali condotti negli ovini e nel coniglio, non hanno né riprodotto le lesioni tipiche dell'infezione né hanno evidenziato sierconversione<sup>9,45</sup>. Il virus può replicare ed essere trasmesso *in vitro*<sup>46</sup>, o *in vivo* nell'organismo murino, ma ad oggi non è chiaro il ruolo epidemiologico dell'infezione da PCV2 nel topo come fonte di trasmissione alla specie suina. PCV2 è stato anche rilevato nei cinghiali cacciati<sup>47-51</sup> o in corso di PMWS<sup>52-55</sup>, anche se l'epidemiologia dell'infezione da PCV2 in questa specie rimane ad oggi non del tutto conosciuta<sup>56</sup>.

Studi retrospettivi hanno dimostrato che il virus circolava nelle popolazioni suine già prima del 1962 e le caratteristiche lesioni istopatologiche della PMWS sono state poi osservate nel 1985<sup>57</sup>.

La sindrome multisistemica post-svezzamento è stata diagnosticata in tutto il mondo ad eccezione dell'Australia, dove non è stata evidenziata né l'infezione da PCV2 né alcun segno patologico di PMWS. È per questo motivo che oggi viene valutato come un Paese indenne<sup>58,59</sup>. In Italia è stata segnalata per la prima volta nel 1997-98<sup>60-62</sup>.

Diversamente, la PDNS è stata accertata da alcuni anni in suinetti tra 1,5 e 4 mesi di età<sup>63-64</sup> in scrofette o in animali a fine carriera produttiva. È stata rilevata per la prima volta da Smith et al. (1993), nel Regno Unito e successivamente diagnosticata in Corea, nord America ed Europa<sup>32,36,37,65-67</sup>. In Italia è stata osservata in animali il più delle volte provenienti dall'estero, o sottoposti a trattamenti con farmaci immunosoppressivi.

Per quanto attiene alla PRDC, la presenza di PCV2 è stata associata in alcuni casi a manifestazioni patologiche post-natali in Europa, Asia e nord America<sup>9,43,68</sup>. Tuttavia nell'ambito del complesso delle malattie respiratorie del suino, non sempre è possibile dimostrare un ruolo attivo di PCV2 nella patogenesi di PRDC. Infatti in Italia questo complesso è stato segnalato in diverse aziende sia al nord<sup>69</sup> che al centro del Paese<sup>44,48,70</sup>, ma in quest'ultimi casi, non sempre, è stato possibile associare la presenza di PCV2 al complesso sopramenzionato.

## MODALITÀ DI TRASMISSIONE E PATOGENESI

Il virus penetra nell'organismo degli animali recettivi attraverso la via respiratoria o quella genitale.

L'infezione viene contratta da secreti ed escreti di animali infetti, quali secrezioni nasali, tonsillari, bronchiali, feci, urine, saliva e latte<sup>20,71-76</sup>. Il contagio per via genitale si realizza direttamente mediante il coito<sup>74,77-78</sup> o attraverso la contaminazione dell'apparato riproduttivo con il virus contenuto nei secreti ed escreti degli animali infetti.

Per quanto attiene all'utilizzo di seme da impiegare per la fecondazione artificiale, questo dovrebbe provenire da animali previamente saggiati ed esenti da infezioni virali, compreso il Circovirus suino tipo 2.

Studi condotti da Park et al. (2005) e Ha et al. (2009), hanno dimostrato che l'infezione per via intranasale in scrofe gravide nell'ultimo mese di gestazione determina il passaggio del virus al feto per via trans-placentale e lo stesso è stato poi evidenziato in suinetti nati vivi o morti. Negli aborti il virus si rileva in associazione ad anticorpi neutralizzanti e causa edema, distensione dell'addome, emorragie, congestione degli organi interni, epatomegalia e miocarditi<sup>38,79-80</sup>.

Per comprendere la patogenesi di questa infezione virale, sono stati condotti diversi studi che hanno previsto l'infezione sperimentale di suini sia con organi infetti sia con virus isolato e coltivato su colture cellulari<sup>81-83</sup>. I diversi stipti virali utilizzati sono stati inoculati per differenti vie di somministrazione (via oro-nasale, via sottocutanea, via trans-placentale, via intraperitoneale, ecc...), e le difficoltà nel riprodurre le lesioni tipiche da PMWS sono state quelle di utilizzare uno stipte virale virulento in grado di riprodurre le lesioni istologiche tipiche della stessa sindrome. Inoltre studi successivi hanno dimostrato che i suini infetti, hanno una viremia intermittente ed una infezione persistente che può durare fino a 125 giorni dopo infezione sperimentale. Ad oggi il meccanismo con il quale PCV2 persiste nel suino non è conosciuto. I risultati hanno evidenziato in entrambi i casi le tipiche lesioni istopatologiche riferibili alla PMWS, con un diverso grado di severità. Studi successivi<sup>71,84</sup>, hanno dimostrato che nella patogenesi della PMWS sono necessari altri co-fattori per lo sviluppo di tutti i segni clinici della malattia. Tra questi si ricorda l'età dei suini, le condizioni ambientali di stabulazione degli animali, la genetica dei suini, lo stipte virale interessato, l'alimentazione, co-infezioni virali e/o batteriche. Il meccanismo con il quale altri co-fattori possono indurre la formazione dei segni clinici di PMWS ad oggi non è conosciuto. Si ipotizza che la stimolazione antigenica con agenti infettivi e non, presumibilmente incrementa il numero di cellule permissive per la replicazione di PCV2, il quale penetra nella fase "S" del ciclo cellulare. A seguito di ciò ne scaturisce un'alta carica virale di PCV2 nel sangue, tessuti linfoidi e altri organi associati all'espressione della malattia. A livello immunitario si accerta deplezione linfocitaria con diminuzione del numero di cellule mononucleate di sangue periferico ed alterazione dell'espressione di diverse citochine. Il virus si rileva nei macrofagi e nelle cellule dendritiche ma non è stata dimostrata la replicazione del PCV2 in queste matrici. Si ipotizza che l'antigene replichi in diverse sottopopolazioni linfocitarie, in quanto studi condotti da Misinzo et al. (2005), hanno evidenziato che il virus penetra all'interno di cellule appartenenti ad una linea continua di monociti di suino<sup>85</sup> per endocitosi (clatrina-mediata).

La patogenesi dei suini non affetti da PMWS ma con altre PCVD è invece a tutt'oggi sconosciuta.

## SINTOMATOLOGIA

La PMWS colpisce i suini nella fase di post-svezzamento tra le 5 e le 12 settimane d'età<sup>9,86-87</sup> ed è caratterizzata dal progressivo dimagrimento, pallore della cute, difficoltà respiratoria (Foto 2), aumento di volume dei linfonodi inguinali superficiali, diarrea e occasionalmente ittero<sup>9,10,33,85,88,89</sup>. La sindrome non sempre si accerta negli allevamenti dove sono scarse le condizioni igieniche ed è caratterizzata da una bassa prevalenza e un'elevata letalità. Si rileva nei suinetti in corso di viremia attiva o durante co-infezioni virali, come ad esempio il parvovirus suino (PPV), il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV), il virus dell'influenza suina (SIV), il virus della malattia di Aujeszky (SuHV-1), Boka-like virus del suino (PBolikeV) e Torque Teno Viruses del suino (TTVs)<sup>9,10,21,43,68,85,89-93</sup>.

I primi segni clinici che si rilevano in corso di PDNS, sono rappresentati dalle lesioni cutanee multifocali, circoscritte e leggermente sollevate di colorazione rosso scuro circolari e del diametro da 1 a 20 mm (Foto 3). Brevemente, dopo la formazione delle lesioni cutanee, compare febbre ( $\geq 41^\circ\text{C}$ ), anoressia, perdita di peso e dimagrimento. I suini che presentano questi segni clinici, di solito vanno incontro rapidamente a morte e la percentuale media di letalità che si registra in un allevamento è del 20%<sup>65,91</sup>.



Foto 2 - Dimagrimento del suino con difficoltà respiratoria ed evidente ernia ombelicale<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.



Foto 3 - Lesioni cutanee rilevate negli arti posteriori in un suino con Dermatite-nefrite del suino (PDNS)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.



Foto 4 - Suino con sintomatologia riferibile al complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

PRDC (Foto 4) è una malattia che colpisce con maggiore frequenza i suini tra le 16 e le 22 settimane d'età ed i segni clinici che si rilevano sono molto variabili e non specifici. In particolare nei suini in accrescimento e finissaggio si accerta uno scarso accrescimento, decremento dell'efficienza alimentare, letargia, anoressia, febbre, tosse protratta, dispnea<sup>94,95</sup> e refrattarietà alla terapia antibiotica. Le polmoniti che si osservano nella PRDC sono il risultato di una co-infezione da agenti eziologici virali e batterici come ad esempio PCV2, PRRSV, SIV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*<sup>39,68,93-95</sup>. L'identificazione del PCV2 a livello polmonare ha suggerito ad alcuni autori che il virus potrebbe essere un importante agente di sviluppo della PRDC<sup>92</sup>. La consistente presenza del PCV2 ed una bassa prevalenza di altri patogeni virali e/o batterici in alcuni suini con PRDC esaminati in Corea, hanno evidenziato e supportato quanto precedentemente menzionato<sup>43</sup>.

## DIAGNOSI

L'evidenza dei segni clinici della PMWS o le lesioni macroscopiche post-mortem non sono sufficienti per confermare la diagnosi, in quanto il virus è ubiquitario e viene rilevato da metodiche di biologia molecolare e sierologiche. È per questo motivo che la conferma della diagnosi si emette in presenza delle lesioni istopatologiche della stessa, associate alla presenza dell'antigene virale rilevato con prove di immunistochemica o ibridazione "in situ".

### Sindrome multisistemica post-svezzamento del suino (PMWS)

Le principali alterazioni istopatologiche che si osservano in corso di PMWS, si rilevano nei tessuti linfatici. Nelle fasi precoci della sindrome, si accertano lesioni microscopiche che consistono in: 1) infiltrati dei seni subcapsulari con presenza di istiociti aumentati di volume; 2) cellule multinucleate giganti, che nel tempo determinano la distruzione dei follicoli linfatici e che possono anche essere rilevate nelle zone parafollicolari.

In alcuni soggetti è possibile osservare nel timo atrofia della parte corticale e a livello di istiociti o di cellule dendri-

tiche evidenziare inclusioni citoplasmatiche di natura basofila o amfolitica, di forma rotondeggiante e di dimensioni variabili. Nello stato avanzato della PMWS a livello linfatico si accerta un tessuto con presenza di cellule stromali ed accessorie, mentre nel polmone possono essere apprezzate inizialmente polmoniti interstiziali con infiltrati mononucleari peribronchiolari o peribronchiali e successivamente si possono riscontrare peribronchioliti fibrose, bronchioliti fibrose, associate ai setti interstiziali polmonari distesi e ripieni di liquido (edema interstiziale). Nel parenchima del fegato si osservano infiltrati di cellule mononucleate con un variabile numero di epatociti che mostrano segni di apoptosi. In alcuni casi è possibile apprezzare cambiamenti di forma degli epatociti (cito- e cariomegalia; emarginazione della cromatina). In alcuni soggetti inoltre, a livello renale si evidenziano infiltrati di cellule infiammatorie, diversamente da altri organi come il pancreas, l'intestino, lo stomaco, il cuore, le ghiandole surrenali, le ghiandole salivari, dove si possono accertare infiltrati di cellule istiocitarie<sup>20</sup>.

Ad integrazione degli esami precedentemente menzionati, potrebbero essere allestite anche prove di isolamento virale da materiale patologico<sup>20,46,50,51,96</sup>, che se eseguite singolarmente non costituirebbero un criterio di diagnosi di PMWS, ma solo di infezione da PCV2 e di singola reazione positiva. È per questo motivo che per aumentare la specificità della diagnosi post-mortem della PMWS, si prendono in considerazione le lesioni microscopiche sopramenzionate, associate al rilievo dell'antigene virale alle prove di immunistochemica<sup>97-101</sup>.

Tuttavia le metodiche di biologia molecolare applicate alla diagnosi di PMWS in singoli animali in vita, di per sé non costituiscono metodologie probanti di PMWS, rispetto al rilievo delle alterazioni istopatologiche sopramenzionate e alla positività delle prove di immunistochemica condotte sugli organi linfoidi<sup>99,100</sup>. Un ulteriore aspetto critico dell'utilizzo delle metodiche di biologia molecolare, potrebbe essere quello della variabilità del risultato tra differenti laboratori (variazione inter-laboratorio). È per questo motivo che le indagini di biologia molecolare potrebbero essere utilizzate per la diagnosi di allevamento di PMWS come metodica di "screening"<sup>102,103</sup>. Studi epidemiologici indicano che le proporzioni dei casi sospetti, che non corrispondono ai criteri di diagnosi di cui sopra, variano dal 32%<sup>104</sup> al 55%<sup>105</sup>. Per questi casi sono stati proposti i seguenti criteri suggeriti dal gruppo di studio europeo sulle malattie associate al circovirus (PCVD): 1) sospetto su base clinica; 2) esame di almeno 5 soggetti; 3) messa in evidenza delle lesioni caratteristiche nel gruppo di soggetti esaminati; 4) elevata quantità di virus nel contesto delle lesioni osservate.

### Dermatite-nefrite del suino (PDNS)

Le lesioni macroscopiche si evidenziano principalmente nella cute e nel rene. Nel derma si osservano lesioni circolari con una colorazione che varia dal rosso porpora al rosso scuro, di solito sono localizzate nei quarti posteriori, arti, addome, torace, fianchi, occhi ed orecchie (Foto 5). I reni sono aumentati di volume ed hanno la parte corticale pallida con emorragie multiple rotondeggianti delle dimensioni di 2-4 mm di diametro. In alcuni soggetti si rileva congestione renale<sup>67</sup> nella parte midollare associata a linfonodi aumentati di volume ed emorragici (Foto 6).

Le caratteristiche lesioni istopatologiche di PDNS sono rappresentate da gravi vasculiti necrotizzanti, glomerulonefriti fibrinonecrotiche associate a fibrosi e vasculiti necrotiche localizzate nella cute e nella milza<sup>65-67,104,106</sup>. Altre lesioni renali che si possono accertare sono rappresentate da glomerulonefriti essudative, glomerulopielonefriti e nefriti interstiziali. A livello linfonodale si rileva deplezione linfocitaria e occasionalmente necrosi dei linfociti sia a livello corticale che paracorticale. Numerose cellule multinucleate giganti, sono spesso localizzate nella parte corticale e paracorticale. Prove di ibridazione *in situ*, hanno messo in evidenza l'antigene PCV2 nelle cellule epiteliali dei tubuli renali, cellule interstiziali fusiformi e cellule macrofagiche. Quest'ultime sono localizzate nei vasi della pelvi renale e nell'interstizio della corticale e midollare renale<sup>65,106</sup>. Attualmente le vasculiti associate a PDNS implicano un meccanismo immuno-patogenetico non del tutto conosciuto<sup>64,97,104</sup>. Si ipotizza che la



**Foto 5** - Suino con focolai necrotici ed edema cutaneo auricolare, localizzati a livello del padiglione auricolare in corso di Dermatite-nefrite del suino PDNS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.



**Foto 6** - Suinetto in accrescimento, con linfonodi inguinali superficiali ingrossati e congesti in corso di dermatite e nefrite del suino (PDNS)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

formazione delle vasculiti sia rappresentata dalla diretta invasione e replicazione del virus nelle cellule del capillare<sup>107</sup>, con conseguente alterazione della permeabilità del vaso e attivazione delle cellule infiammatorie *in situ*, con distruzione dello stesso capillare. Questa ipotesi non è stata a tutt'oggi dimostrata, in quanto nelle vasculiti da PDNS non è mai stato messo in evidenza direttamente l'antigene virale.

In sede di diagnosi differenziale, la PDNS deve essere distinta dalle altre malattie del suino che hanno come organo bersaglio la cute: 1) Il mal rosso; 2) *Actinobacillus suis*; 3) L'epidermite essudativa; 4) Il vaiolo suino; 5) *Salmonella spp*; 6) La peste suina classica (PSC) e la peste suina africana (ASF) allorché dovessero essere implicati stipiti virali a bassa patogenicità<sup>108,109</sup>.

### Complesso delle Malattie Respiratorie del Suino (PRDC)

Attualmente la diagnosi dell'infezione da PCV2 associata alla PRDC viene emessa quando si verificano i seguenti criteri: 1) Presenza di evidenti segni clinici respiratori (dispnea, refrattarietà agli antibiotici); 2) lesioni polmonari microscopiche caratteristiche dell'infezione; 3) presenza dell'antigene PCV2 nelle lesioni polmonari; 4) assenza delle caratteristiche lesioni da PMWS nei tessuti linfoidi. La diagnosi di PMWS viene accertata nei suini che presentano le caratteristiche lesioni microscopiche da PRDC nel polmone e nei tessuti linfoidi. PCV2 associato alla PRDC potrebbe essere differenziato dalla PMWS sia clinicamente che istopatologicamente. Dal punto di vista clinico, PMWS è caratterizzata da cachessia, dispnea ed occasionalmente da pallore nei soggetti giovani, tipicamente tra le 8 e le 16 settimane d'età<sup>9,86,88</sup>. Istologicamente le lesioni rilevate in animali affetti da PCV2 associati a PRDC sono rappresentate da broncopolmonite interstiziale, fibrosi peribronchiale, in assenza delle caratteristiche lesioni da PMWS nei tessuti differenti da quello polmonare. Diversamente, la PMWS è caratterizzata da infiammazione granulomatosa, cellule giganti multinucleate con corpi inclusi intracitoplasmatici basofili e infiltrati di istiociti e macrofagi<sup>10,86</sup>. Le principali lesioni microscopiche rilevate nel complesso delle malattie respiratorie sono rappresentate da broncopolmoniti interstiziali e peribronchioliti fibrose. I setti alveolari sono infiltrati da macrofagi, linfociti e cellule plasmatiche. Molti setti alveolari sono ispessiti e contengono pneumociti di tipo 2 ipertrofici.

Anche l'identificazione del PCV2 in alcuni casi di polmonite necrotizzante proliferativa (PNP) suggerisce che il virus potrebbe essere un importante agente di sviluppo della PRDC<sup>92</sup>. Non è escluso che il ruolo del PCV2 nella PRDC potrebbe essere quello dell'interazione con altri microrganismi. Infatti, in uno studio condotto da Kim et al. (2003), è stata evidenziata una contemporanea infezione sia del PCV2 che del virus PRRS mostrando un sinergismo di entrambi gli agenti eziologici<sup>9,68</sup>. Non c'è dubbio, che l'azione patogena del virus della PRRS associata a quella del PCV2, induce uno stato di maggiore immunosoppressione dell'organismo ospite<sup>9</sup>. Infatti, studi sperimentali di co-infezioni indotte con PCV2 e PRRS hanno evidenziato una grave sintomatologia respiratoria associata a lesioni polmonari<sup>68</sup>, con particolare riferimento allo sviluppo della broncopolmonite interstiziale, compatibile con le tipiche lesioni riscontrate nei suini affetti da PRDC. Diversamente, uno studio condotto da Petrini et al. (2010), nel centro Italia, ha evidenziato po-

chi casi di co-infezione tra il virus PRRS e PCV2, mentre la maggior parte delle aziende saggiate evidenziava una positività al virus PCV2 seguita dal virus PRRS (stipite europeo). Nessun accertamento virale si riscontrava nei confronti di altri virus potenzialmente responsabili di PRDC<sup>44</sup>. Da questo studio, gli Autori hanno evidenziato inoltre che a livello di azienda, le positività riscontrate hanno originato un diverso comportamento clinico. In particolare negli allevamenti con positività al virus PRRS sono stati accertati i segni clinici classici della malattia, mentre nelle aziende con positività al virus PCV2 sono stati rilevati sintomi respiratori, febbre, anoressia, letargia, ipersecrezione nasale, pallore delle mucose, riluttanza al cibo. Diversamente, nelle aziende dove sono stati accertati entrambi i virus (PRRS, PCV2), le condizioni cliniche erano molto gravi, in quanto gli animali oltre ad evidenziare severa sintomatologia clinica respiratoria ed enterica presentavano pallore della cute, ipersecrezione nasale, letargia, anoressia, febbre e difficoltà di accrescimento.

## CONTROLLO DELLE MALATTIE ASSOCIATE ALL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS (PCVD)

### Management aziendale

Madec e coll.<sup>110</sup> hanno studiato la PMWS in diverse aziende francesi, osservando la mortalità, il periodo più critico per lo sviluppo dei segni clinici della malattia, la risposta alla somministrazione degli antibiotici e l'osservazione della localizzazione delle lesioni agli organi interni. Hanno inoltre verificato la presenza di altre infezioni virali (PRRS) e hanno osservato che il PCV2 era sempre associato alle lesioni tipiche della PMWS. Nello studio hanno proposto inoltre un piano di profilassi igienica nelle aziende coinvolte nello stesso. Le principali raccomandazioni descritte nel piano sopramenzionato includevano: 1) tutto pieno - tutto vuoto; 2) disinfezioni; 3) limitati contatti degli animali; 4) uniformità dei lotti di suini; 5) isolare gli animali malati da quelli sani; 6) mantenere le temperature ideali nei box; 7) appropriato ricambio d'aria nelle stalle; 8) uso di antiparassitari; 9) utilizzo di appropriati programmi vaccinali.

In conclusione gli autori riferiscono che nelle aziende dove è stato adottato il piano di profilassi igienica è stata osservata una significativa riduzione dei segni clinici post svezzamento originati dalla PMWS.

### Controllo delle co-infezioni

Ci sono differenze significative tra gli esperimenti clinici e le situazioni di campo riguardanti il controllo delle co-infezioni in corso di PMWS, PDNS, PRDC<sup>111-114</sup>. In particolare la vaccinazione per la profilassi di altre malattie, deve essere praticata con estrema attenzione, in quanto l'effetto immunostimolatorio evocato dai prodotti immunizzanti, potrebbe determinare un aumento dell'incidenza dei casi di PMWS<sup>115,116</sup>. È noto infatti che l'effetto sopramenzionato si esplica nella riduzione del numero di cellule mononucleate (monociti/macrofagi) con conseguente diminuzione delle difese immunitarie dell'organismo ospite. In particolare si ha una riduzione dei linfociti CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, T helper, con successiva depressione della risposta immunitaria e predisposizione a infezioni batteriche secondarie e a superinfezioni.

### Razze

Sono state riportate differenze di suscettibilità alla PMWS in base a diverse linee genetiche. In uno studio condotto da Lopez-Soria e coll.<sup>117</sup> sono state prese in esame due aziende suine. Diverse scrofe di ciascun sito produttivo, sono state fecondate con seme proveniente dalle seguenti razze: 1) 100% Pietrain; 2) 50% Large White x 50% Pietrain; 3) 25% Large White x 75% Duroc e lo stesso è stato controllato in PCR nei confronti del PCV2. I risultati hanno evidenziato che tutto il seme utilizzato risultava negativo in PCR e la mortalità dei suinetti neonati, con evidenti lesioni da PMWS, risultava essere maggiore nelle scrofe fecondate con il seme di soggetti 25% Large White x 75% di Duroc, seguito dalle femmine inseminate con il seme di soggetti 50% Large White x 50% di Pietrain ed infine la mortalità minore era rappresentata dalle scrofe fecondate con il seme di soggetti 100% Pietrain.

### Alimentazione

L'utilizzo degli antiossidanti come additivi nella razione alimentare coniugato con l'acido linoleico e plasma nella razione alimentare potrebbe ridurre gli aspetti sintomatologici della PMWS<sup>118,119</sup>. Questo è stato dimostrato da studi clinici i quali hanno evidenziato che l'utilizzo della selenometionina riduce la replicazione virale del PCV2 in colture cellulari della linea PK-15. L'azione antivirale indotta dalla selenometionina presumibilmente avviene bloccando il sistema enzimatico della glutatione perossidasi<sup>120</sup>. È stato inoltre dimostrato, che la somministrazione dei fitosteroli nella dieta, riduce le lesioni da PRDC o PMWS<sup>121</sup>.

### Profilassi

In Europa sono stati registrati tre vaccini nei confronti di PCV2, i quali possono essere somministrati ai suinetti dai tre giorni fino alle quattro settimane di età, ed uno di questi, di recente è stato registrato anche per la vaccinazione di scrofe e scrofette (Tabella 1). Le scrofe possono essere vaccinate a distanza di 3-4 settimane con un successivo inoculo almeno 2 settimane prima del parto, mentre le scrofette possono essere immunizzate con la somministrazione di due vaccinazioni a distanza di 3-4 settimane e con un ulteriore inoculo almeno due settimane prima dell'accoppiamento ed un ulteriore richiamo 2 settimane antecedenti la data presunta del parto. I suinetti vaccinati dopo due settimane di età, producono anticorpi i quali riducono i segni clinici delle PCVD, aumentano l'indice di conversione alimentare e la resa al macello, oltre a diminuire la perdita di peso e la riduzione della mortalità. Possono inoltre ridurre la circolazione virale all'interno dell'allevamento, sia durante la fase di svezzamento che di ingrasso<sup>121,122</sup>. Tutti i vaccini sono stati valutati sia in condizioni sperimentali che di campo e i risultati hanno evidenziato una riduzione dell'incidenza delle malattie associate all'infezione da PCV2<sup>123</sup>. L'utilizzo della profilassi immunizzante in animali indenni da Circovirus suino tipo 2 riduce inoltre le co-infezioni<sup>124</sup> e il grado di lesioni riscontrate nei tessuti linfoidi<sup>123</sup>. Indagini sperimentali, hanno anche evidenziato che la vaccinazione riduce la viremia attiva e le lesioni microscopiche osservate negli organi linfoidi<sup>125-127</sup>. La possibilità degli anticorpi colostrali di interferire sulla risposta umorale indotta dalla vaccinazione richiede ulteriori studi clinici, sia in condizioni sperimentali che di campo. Un dubbio rimane sul ruolo degli anticorpi neutralizzanti indotti dalla vaccinazione. Non è infatti del tutto chiaro se con-

**Tabella 1** - Vaccini disponibili in commercio nei confronti del Circovirus suino tipo 2 (PCV2)<sup>1</sup>.

Vaccino	Ditta Farmaceutica	Antigene	Via di Somministrazione	Autorizzato per:
Ingelvac CircoFLEX®*	Boehringer Ingelheim	PCV2, proteina ORF2	1 ml, IM, singola dose	Suinetti (>2 settimane d'età)
Suvaxyn PCV®**	Fort Dodge	PCV1-2 inattivato, ricombinante (chimera)	2 ml, IM, singola dose	Suinetti (>4 settimane d'età)
Porcilis PCV®*	Intervet-Schering Plough Animal Health	PCV2, proteine ORF2, Cap2	2 ml, IM, singola dose	Suinetti (>3 giorni/3 settimane d'età)
Circovac®*	Merial	PCV2 inattivato	2 ml, IM, 2 dosi	Scrofe in gravidanza/ Scrofette/suinetti (>3 settimane d'età)

<sup>1</sup> Fonte: Grau-Roma et al. (2011). \*Vaccini commercializzati in Europa. \*\*Autorizzazione sospesa in ambito europeo.

feriscono una protezione totale nei confronti del virus omologo e se vengono trasmessi sotto forma di immunità passiva colostrale<sup>128</sup>.

In una ricerca condotta negli anni 2007-2009<sup>129</sup> presso lo stabilimento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche in suini ibridi commerciali sieronegativi nei confronti del Circovirus suino tipo 2 è stato valutato un prodotto immunizzante nei confronti della stessa infezione virale. Nello studio è stato utilizzato un vaccino inattivato e inoculato alla dose di 1 ml/capo per via intramuscolare. A diversi intervalli di tempo (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 giorni post vaccinazione, PVD) sono stati eseguiti rilievi clinici, virologici, immunologici, sierologici e al termine dell'esperimento da tutti gli animali sono stati eseguiti esami necroscopici, istopatologici, virologici e immunoistochimici. I risultati di questo studio, hanno evidenziato che il prodotto utilizzato è stato in grado di evocare la produzione di immunoglobuline di tipo M (IgM) e di tipo G (IgG) dopo 14 PVD e mantenute fino al termine dell'esperimento. Diversamente gli anticorpi neutralizzanti sono stati rilevati solo dopo 35 PVD. Le indagini immunologiche hanno rilevato la produzione di linfociti T CD3<sup>+</sup> dopo 14 PVD per poi decrementare a 30 PVD. È stato inoltre accertato un incremento delle sottopopolazioni linfocitarie CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (effettori della memoria) dopo 14 PVD e mantenuti fino al termine dell'esperimento. Nessun isolamento virale riferito al PCV2 o altro virus (PRRS, SuHV, PPV, Influenza) è stato effettuato durante tutto l'esperimento. All'esame istopatologico, si rilevavano principalmente lesioni a livello linfonodale riferibili a iperplasia reattiva, associate ad esami immunoistochimici positivi allestiti nei confronti del PCV2 a livello dei linfonodi inguinali superficiali e di tonsilla palatina.

## CONCLUSIONI

Sulla base delle attuali conoscenze la PMWS è stata evidentemente la sindrome più studiata sotto il profilo clinico e patologico. In questa *review* sono state prese in considerazione oltre alla PMWS, anche la PDNS e la PRDC, in quanto la letteratura più recente le associa all'infezione da PCV2.

In generale, le malattie associate al circovirus suino tipo 2, sono in grado di determinare un forte impatto economico sulle produzioni suinicole mondiali a motivo della loro diffusione cosmopolita. Per tale ragione il loro controllo è di fondamentale importanza come pure l'adozione di opportune strategie di prevenzione nelle diverse tipologie di allevamento. Dopo aver confermato la diagnosi, è necessario effet-

tuare una valutazione dei fattori di rischio per ciascuna azienda ed attuare opportuni programmi di profilassi diretta ed indiretta.

D'altro canto, l'incompleta comprensione di molti aspetti riguardanti tali patologie, rende ancora difficile l'adozione di protocolli operativi di prevenzione e controllo di sicura efficacia.

Di conseguenza, accanto alla profilassi immunizzante, non dovranno essere trascurate l'applicazione di corrette pratiche manageriali (buone pratiche di allevamento) e di misure di igiene ambientale-zootecnica in grado di elevare i livelli di biosicurezza dell'allevamento ed i parametri del benessere animale.

## ■ Porcine Circovirus type 2 (PCV2) associated diseases

### SUMMARY

To date, PCV2 infection in domestic pigs and wild boars is widespread worldwide and has been associated with several syndromes, collectively called porcine circovirus diseases (PCVD). They include: postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy (PDNS), and, in some cases, porcine respiratory disease complex (PRDC).

PMWS only is considered to have the higher economic impact on pig farms. It is considered a multifactorial disease in which PCV2, in combination with other factors, is able to determine the clinical signs of the disease. Its main clinical signs were observed in piglets and in fattening pigs; wasting is considered to be the major one. This syndrome is diagnosed by detection of histopathological lesions typical of lymphoid tissues and the simultaneous presence of PCV2 antigen.

PDNS is a disease characterized by immuno-complexes, fibrino-necrotizing glomerulonephritis and necrotizing vasculitis. These lesions are associated with PCV2, but to date the pathogenetic role of the virus in the development of such lesions has not yet been demonstrated.

As to PRDC, the identification of PCV2 in the lungs suggested that the virus could play a key role in determining it, especially in the presence of a low prevalence of other viral pathogens and/or bacterial. Currently, the clinical signs of PRDC are highly variable and nonspecific. Three vaccines are now available in Europe. Two of them are to be used for piglets only, while the third one is licensed for both sows and piglets.

## KEY WORDS

PCV2, aetiology, symptomatology, diagnosis, control.

## Bibliografia

- Harding J. (1996) Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical finding. In: Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners, Saskatoon, Canada, P. 21.
- Clark E. (1997) Postweaning multisystemic wasting syndrome. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Quebec City, Canada. Pp. 499-501.
- LeCann P., Albina E., Madec F., Cariolet R., Jestin A. (1997) Piglet wasting diseases. *Vet Rec* 141: 69-75.
- Segales J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., Del Pozo M., Noval R., Sacristan C., De las heras A., Ferro A., Latimer K.S. (1997) First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601.
- Spillane P., Kennedy S., Meehan B., Allan G. (1998) Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec* 143: 511-512.
- Choi C., Chae C. (1999) In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 265-270.
- Hinrichs U., Ohlinger V.F., Pesh S., Wang L., Tegeler R., Delbeck F.E.J., Wendt M. (1999) First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. *Tierärztliche Umschau* 54: 255-258.
- Onuki A., Abe K., Togashi K., Kawashima K., Taneichi A., Tsunemitsu H. (1999) Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci* 61: 1119-1123.
- Allan G., Ellis J. (2000) Porcine circovirus a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.
- Choi C., Chae C. (2000) Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2 infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 123: 302-305.
- Kiss I., Kecskemeti S., Tuboly T., Bajmocy E., Tanyi J. (2000) New pig disease in Hungary: Postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet Hung* 48: 469-475.
- Vyt P., Labar G., Bos M., Nauwynck H., Roels S., Miry C., Pensaert M., Ducatelle R. (2000) The "post-weaning multisystemic wasting syndrome" in Belgium. *Flemish Vet J* 69: 435-440.
- Wellemborg G.J., Pesh S., Berndsen F.W., Steverink P.J., Hunneman W., Van der Vorst T.J., Peperkamp N.H., Ohlinger V.F., Schippers R., Van Oirschot J.T. de Jong M.F. (2000) Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Vet Q* 22:167-172.
- Borel N., Burgi E., Kuipel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Pospischil A., Sydler T. (2000) Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 143: 249-255.
- Trujano M., Iglesias G., Segales J., Palacios J.M. (2001) PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec* 148: 792.
- Celer J.R., Carasova P. (2002) First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection in pigs in the Czech Republic by semi-nested PCR. *J Vet Med B, Inf Dis Vet Pub H* 49: 155-159.
- Sarradel J., Perez A.M., Andrada M., Rodriguez F., Fernandez A., Segales J. (2002) PMWS in Argentina. *Vet Rec* 150: 323.
- Saoulidis K., Kyriakis S.C., Kennedy S., Lekkas S., Miliotis C.C., Allan G., Balkamos G.C., Papoutsis P.A. (2002). First report of postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *J Vet Med B, Inf Dis Vet Pub H* 49: 202-205.
- Armstrong D., Bishop S.C. (2004) Does genetics or litter effect influence mortality in PMWS. In: Proceedings of International Pig Veterinary Society Congress. P. 809.
- Segales J., Allan G.M., Domingo M. (2005) Porcine circovirus diseases. *Animal Health Res Rev* 6: 119-142.
- Blomstrom A.L., Belak S., Fossom C., McKillen J., Allan G., Wallgren P., Berg M. (2009) Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vir Res* 146(1-2): 125-129.
- Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., Le Cann P., Jestin A., Segales J., Chmielewicz B., Plana-Duran J., Sike D. (2000) Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Vir Res* 66: 65-77.
- Nawagitgul P., Morozov L., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S. (2000) Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81: 2281-2287.
- Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J.A., Krakowka S., Allan G.M. (2001) Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol* 146: 835-842.
- Liu J., Chen I., Kwang J. (2005) Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 79: 8262-8274.
- Chaiyakul M., Hsu K., Hatherell A., Dardari R., Marshall F., Czub M. (2010) Cell-Dependent susceptibility to porcine circovirus ORF-3-induced apoptosis. In: Proceedings International Pigs Veterinary Society (IPVS), 1:53.
- 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.
- Tischer L., Gelberblom H., Vetterman W., Koch M.A. (1974) Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie (Reihe B)*, 226: 153-167.
- Royer R.L., Nawagitgul P., Halbur P.G., Paul P.S. (2001) Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swin Health Prod* 281: 284.
- Martin H., Le Potier M.F., Maris P. (2008) Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet J* 177: 388-393.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (2008) Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 327-334.
- Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft B., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Meehan B.M., Adair B.M. (1998) Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting diseases in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10: 3-10.
- Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Wilson P., Strokape J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D., Haines D. (1998) Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39: 44-51.
- Meehan B.M., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V.A., Ellis J., Hassard L.E., Clark E.G., Haines D.M., Allan G.M. (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79: 2171-2179.
- Opriessnig T., Meng X.J., Halbur P.G. (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestation, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.
- Rossell C., Segales J., Ramos-Vara J.A., Folch J.M., Rodriguez-Arriola G.M., Duran C.O., Balasch M., Plana-Duran J., Domingo M. (2000) Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 40-43.
- Sarli G., Mandrioli L., Panarese S., Brunetti B., Segales J., Domonguez J., Marcato P.S. (2008). Characterization of Interstitial Nephritis in Pigs with Naturally Occurring Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Vet Pathol* 45: 12-18.
- West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.M., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly F., Konoby C., Martin K. (1999) Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11: 530-532.
- Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Chae C. (2004) Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res* 68: 218-221.
- Jensen T.K., Vigre H., Svensmark B., Bille-Hansen V. (2006) Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis. *J Comp Pathol* 135: 176-182.
- Drolet R., Larochelle R., Morin M., Belisle B., Magar R. (2003) Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol* 40: 143-148.
- Grau-Roma L., Segales J. (2007) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza AND Aujeszky's disease virus in case of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microb* 119: 144-151.
- Kim J., Chung H.K., Chae C. (2003) Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 166: 251-256.
- Petrini S., Panicià M., Silenzi V., Briscolini S., Magistrali C., Filippini G., Sensi M., Gavaudan S., Ciuti F., Fortunati M., Pezzotti G. (2010) Presence of viral pathogens in cases of porcine respiratory diseases complex (PRDC) in central Italy. In: Proceedings International Pigs Veterinary Society (IPVS) 2: 331.
- Quintana J., Balasch M., Segales J., Calsamiglia M., Rodriguez-Arriola G.M., Plana-Duran J., Domingo M. (2002) Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res* 33: 229-237.
- Petrini S., Panicià M., Fortunati M., Villa R., Gavaudan S., Silenzi V., Barchiesi F., Mancini P., Ferrari M. (2010) Prove di replicazione e trasmissione virale riferite al circovirus suino tipo 2 (PCV2) in colture



- cellulari di origine murina. Atti del XII Convegno Nazionale della Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDILV), Pp. 329-330.
47. Gavaudan S., Petrini S., Piersimoni A., Barboni C., Briscolini S., Panicià M., Barocci S., Ferrari M., Bartolini C., Tonucci F., Fogliani A. (2007) Infezione da Circovirus suino tipo 2 (PCV2) nel cinghiale: osservazioni preliminari. Atti del II Workshop nazionale di virologia veterinaria, ISTISAN Congressi 07/C3, Pp. 40.
  48. Barocci S., Gavaudan S., Villa R., Sebastiani C., Bartolini C., Briscolini S., Puricelli M., Panicià M., Ferrari M., Petrini S. (2007) Caratterizzazione molecolare di diversi ceppi di circovirus suino tipo 2 (PCV2) isolati nel cinghiale. Atti del IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDILV), Pp. 86-87.
  49. Petrini S., Gavaudan S., Barocci S., Briscolini S., Sebastiani C., Mancini P., Panicià M., Villa R., Ferrari M. (2008) Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stiptipi di Circovirus suino tipo 2 (PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia. Atti della Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini (SIPAS), Pp. 239-245.
  50. Gavaudan S., Barocci S., Briscolini S., Mancini P., Morandi F., Panicià M., Ferrari M., Villa R., Petrini S. (2008) Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boars in central Italy. In: Proceedings International Pig Veterinary Society (IPVS) 2: 63.
  51. Petrini S., Barocci S., Gavaudan S., Villa R., Briscolini S., Sabbatini M., Mattozzi C., Barchiesi F., Salamida S., Ferrari M., Pezzotti G. (2009) Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wildboars in central Italy. *Eur J Wild Res* 55: 465-469.
  52. Ellis J., Spinato M., Yong C., West K., McNeilly F., Meehan B., Kennedy S., Clark E., Krakowka S., Allan G. (2003) Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J Vet Diagn Invest* 15: 364-368.
  53. Schultz C., Segales J., Neumann G., Hlinak G., Calsamiglia M., Domingo M. (2004) Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus Scrofa*) *Vet Rec* 154: 694-696.
  54. Lipej Z., Segales J., Jemersic L., Olvera A., Roic B., Novosel D., Mihaljevic Z., Manojlovic L. (2007) First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung* 55: 389-404.
  55. Morandi F., Verin R., Sarli G., Cannetti N., Scacco M., Panarese S., Poli A. (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen localisation and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in free-ranging wild boar (*Sus scrofa ssp scrofa*) in Italy. *Eur J Wild Res* 56: 717-724.
  56. Vincente J., Segales J., Hofle U., Balasch M., Plana-Duran J., Domingo M., Gortazar C. (2004) Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus Scrofa*) *Vet Res* 35: 243-253.
  57. Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segales J., Baumgaertner W. (2009) Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microb* 138: 27-33.
  58. Raye W., Muhling J., Warfe L., Buddle J.R., Palmer C., Wilcox G.E. (2005) The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. *Aust Vet J* 83: 300-304.
  59. Finlaison D., Kirkland P., Loung R., Ross A. (2007) Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. *Aust Vet J* 85: 304-310.
  60. Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999) Indagini clinico patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning multisystemic wasting syndrome) in suini del nord Italia. *Large Animals Review*, 5(2), 47-62.
  61. Martelli P., Terreni M., Borghetti P., Amenna N., Morvan H., Cavarani S. (2000) Aspetti clinici e diagnostici in corso di focolaio di sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), vol. XXVI, Pp. 255-269.
  62. Fiorentini L., Poggiali M., Tosi G., Paganelli F., Massi P. (2004) Descrizione di un caso di sindrome multi sistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS) associato all'isolamento di *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* in un allevamento suino del nord Italia. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), vol. XXX, Pp. 407-412.
  63. Smith W.J., Thomson J.R., Done S. (1993) Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec* 132: 47.
  64. Thibault S., Drolet R., Germain M.C., D'Allaire S., Larochelle R., Magar R. (1998) Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 35: 108-116.
  65. Choi C., Chae C. (2001) Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 38: 436-441.
  66. Duran C.O., Ramos-Vara J.A., Render J.A. (1997) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *J Swin Heat Prod* 5: 241-245.
  67. Ramos-Vara J.A., Duran O., Render J.A., Craft D. (1997) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet Rec* 141: 479-480.
  68. Harms P.A., Halbur P.G., Sorden S.D. (2002) Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swin Heat Prod* 10: 27-30.
  69. Alborali L.G., Pavesi R., Gradassi M., Sarli G., Zanoni M., Salogni C., Giovannini S. (2010) Co-infection in PMWS field cases in Italian herds. In Proceedings International Pig Veterinary Society 2: 453.
  70. Petrini S., Sabbatini M., Briscolini S., Silenzi V., Fortunati M., Panicià M. (2009). Indagini virologiche nei confronti del circovirus suino tipo 2 (PCV2) e del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV) nel centro Italia. Atti del Workshop di virologia veterinaria, Pp. 77.
  71. Krakowka S., Ellis J.A., Meehan B., Kennedy S., McNeilly F., Allan G. (2000) Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37: 254-263.
  72. Larochelle R., Bielanski A., Muller P., Magar R. (2000) PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microb* 38: 4629-4632.
  73. Shibata I., Okuda Y., Yazawa S., Ono M., Sasaki T., Itagaki M., Nakajima N., Okabe Y., Hidejima I. (2003) PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65: 405-408.
  74. Shibata I., Okuda Y., Kitajima K., Asai T. (2006) Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J Vet Med* 53: 278-280.
  75. Ha Y., Ahn K.K., Kim B., Cho K.D., Lee B.H., Oh Y.S., Kim S.H., Chae C. (2009) Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Res Vet Sci* 86: 108-110.
  76. Park J.S., Ha Y., Know B., Cho K.D., Lee B.H., Chae C. (2009) Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* 140: 208-211.
  77. Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. (2008) Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogen* 69: 814-821.
  78. Madson D.M., Ramamoorthy S., Kuster C., Pal N., Meng X.J., Halbur P.G., Opriessnig T. (2009) Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet Res* 40: 10.
  79. Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F., Schonheit J. (2007) Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. *J Vet Diagn Invest* 19: 368-375.
  80. Dipongkor S., Lefebvre D.J., Van Doorssealere, Atanasova K., Barbè F., Geldhof M., Karniychuk U.U., Nauwynck H.J. (2010) In: Proceedings International Pig Veterinary Society 1: 54.
  81. Balasch M., Segales J., Rossell C., Domingo M., Mankertz A., Urniza A., Plana-Duran J. (1999) Experimental inoculation of convention pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 139-148.
  82. Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., Mcneilly F. (1999) Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest*, 11: 3-14.
  83. Magar R., Larochelle R., Thibault S., Lamontagne L. (2000) Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol* 123: 258-269.
  84. 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 syndrome disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38: 31-42.
  85. Misinzo G., Meerts P., Bublot M., Mast J., Weingartl H.M., Nauwynck H.J. (2005) Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytes line 3D4/31. *J Gen Virol* 86: 2057-2068.
  86. Kim J., Chae C. (2002) Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest* 14: 236-240.
  87. Pallares F.J., Halbur P.G., Opriessnig T., Sorden S.D., Villar D., Janke B.H., Yaeger M.J., Larson D.J., Schwartz K.J., Yoon K.J., Hoffman L.J. (2002) Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14: 515-519.
  88. Harding J.C., Clarck E.G. (1997) Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swin Heat Prod* 5: 201-203.
  89. Allan G.M., Kennedy S., McNeilly F., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka

- S.J., Meehan B.M., Adair B.M. (1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121: 1-11.
90. Blomstrom A.L., Belak S., Fossum C., Fuxler L., Wallgren P., Berg M. (2010) Studies of porcine circovirus type 2, porcine boka-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Vir Res* 152: 59-64.
91. Savic B., Milicevic V., Bojkovski J., Kureljusic B., Ivetic V., Pavlovic I. (2010) Detection rates of the swine torque teno viruses (TTVs), porcine circovirus type 2 (PCV2) and hepatitis E virus (HEV) in the livers of pigs with hepatitis. *Vet Res Commun* 34: 641-648.
92. Ellis J., Krakowka S., Allan G., Clark E., Kennedy S. (1999) The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus has expanded since 1987: an alternative perspective. *Vet Pathol* 36, 262-265.
93. Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M. (2000) Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122: 9-24.
94. Halbur P.G. (1998) Porcine respiratory disease. In: *Proceedings International Pig Veterinary Society* 15: 1-10.
95. Thacker E.L. (2001) Porcine respiratory disease complex - what is it and why does it remain a problem? *The pig Journal* 48: 66-70.
96. Sorden S. (2000) Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Swin Health Prod* 8: 136.
97. Rossel C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arriola G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M. (1999) Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120: 59-78.
98. Brunborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. (2004) Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122, 171-178.
99. 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: 75-80.
100. 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 fecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microb* 111: 223-229.
101. Vilcek S., Vlasakova M., Jackova A. (2010) Lux real time PCR assay for the detection of porcine circovirus type 2. *J Virol Methods*, 165(2): 216-221.
102. Harding J.C., Backer 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: 7-14.
103. Hijulsager C.K., Grau-Roma L., Sibila M., Enoe C., Larsen L., Segales J. (2009) Interlaboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microb* 133: 172-178.
104. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy. *Vet Rec* 164: 519-523.
105. Grau-Roma L., Hijulsager C.K., Sibila M., Kristensen C.S., Lopez-Soria S., Enoe C., Casal J., Botner A., Nofrarias M., Bille-Hansen V., Fraile L., Baekbo P., Segales J., Larsen L.E. (2009) Infection, excretion and sero-conversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microb* 135: 272-282.
106. Choi C., Kim J., Kang J.J., Chae C. (2002) Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Vet Rec* 151: 484-485.
107. Lie J.T. (1996) Vasculitis associated with infectious agents. *Cur Opin Rheum* 8: 26-29.
108. Moenning V., Floegel-Niesmann G., Greiser-Wilke I. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* 165: 11-20.
109. King D.P., Reib S.M., Hutchings G.H., Grierson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Batos A.D.S., Drew T.W. (2003) Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107: 53-61.
110. Madec F., Eveno E., Morvan P., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amenna N., Truong C., Maha D., Albina E., Jestin A. (2000) Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France. Clinical observation from follow-up studies on affected farms. *Liv Prod Science* 63: 223-233.
111. Kritas S.K., Alexopoulos C., Kyriakis C.S., Tzika E., Kyriakis S.C. (2007) Performance of fattening pigs in a farm infected with both porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus type 2 following sow and piglet vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *J Vet Med (Series A)* 54: 287-291.
112. Opriessnig T., Fenaux M., Yu S., Evans R.B., Cavanaugh D., Gallup J.M., Pallares F.J., Thacker E.L., Lager K.M., Meng X.J., Halbur P.G. (2004) Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microb* 98: 209-220.
113. Haruna J., Hanna P., Hurnik D., Ikede B., Miller L., Yason C. (2006) The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can J Vet Res* 70: 269-276.
114. Genzow M., Schwartz K., Gonzalez G., Anderson G., Chittick W. (2009) The effect of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) on the porcine circovirus-2 (PCV-2) load in porcine circovirus associated disease (PCVAD) affected pigs. *Can J Vet Res* 73: 87-90.
115. 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.
116. Opriessnig T., Halbur P.G., Yu S., Thacker E.L., Fenaux M., Meng X.J. (2006) Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec* 158: 149-154.
117. Lopez-Soria S., Segales J., Nofrarias M., Calsamiglia M., Ramirez H., Minguez A., Serrano I.M., Marin O., Callen A. (2004) Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec* 155: 504.
118. Bassaganya-Riera J., Pogranichniy R.M., Jobgen S.C., Halbur P.G., Yoon K.J., O'Shea M., Mohede I., Hontecillas R. (2003) Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J Nutr* 33: 3204-3214.
119. Donadeu M., Waddilove J., Marco E. (2003) European management strategies to control postweaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proceedings of the Allen D Leman Swine Conference*, Minneapolis, USA, pp. 136-142.
120. Pan Q., Huang K., He K., Lu F. (2008) Effect of different selenium sources and levels on porcine circovirus type 2 replication in vitro. *J Trade Elem Med Biol* 22: 143-148.
121. Fossum C. (2010) Porcine circovirus type 2: success and failure. In: *Proceedings International Pig Veterinary Society* 1:20-24.
122. Opriessnig T., Madson D., Shen H., Brockmeier S., Beach N., Meng X.J. (2010) PCV2 vaccination prevented clinical PCVAD and reduced PCV2 viremia and semen virus shedding in boars concurrently infected with PCV2b and *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: *Proceedings International Pig Veterinary Society* 2:427.
123. Segales J., Urniza A., Alegre A., Bru T., Crisci E., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Balasch M., Sibila M., Xu Z., Chu H.J., Fraile L., Plana-Duran J. (2009) A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27: 7313-7321.
124. Kixmoller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmuller A., Elbers K., Fachinger V. (2008) Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26: 3443-3451.
125. Fort M., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F., Segales J. (2008) Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographical origins. *Vaccine* 26: 1063-1071.
126. Fort M., Sibila M., Perez-Martin E., Nofrarias M., Mateu E., Segales J. (2009) One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27: 4031-4037.
127. Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X.J., Halbur P.G. (2010) Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microb* 142(3-4): 177-183.
128. Fort M., Olvera A., Sibila M., Segales J., Mateu E. (2007) Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microb* 125: 244-255.
129. Petrini S., Panicià M., Silenzi V., Fortunati M., Bresaola M., DeMia G.M., Osorio F. (2011) Study of the neutralizing antibodies in pigs PMWS-free and vaccinated against PCV2. 30th Annual Meeting, American Society for Virology, July 16-20, 2011 (Accepted).