

# Interazione tra PCV2 e sistema immunitario. Cosa è cambiato dopo l'introduzione della profilassi vaccinale



GIULIA D'ANNUNZIO, FABIO OSTANELLO, GIUSEPPE SARLI

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

## RIASSUNTO

Le malattie da PCV2 (*porcine circovirus diseases* - PCVD) sono una delle cause più importanti di perdite economiche nell'allevamento intensivo del suino. PCV2 causa sia forme cliniche sistemiche (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS), sia forme localizzate di tipo enterico, respiratorio, dermatitico-nefritico e riproduttivo. PCV2 è anche responsabile di forme subcliniche di infezione che, tuttavia, provocano ritardo dell'accrescimento, aumento del numero degli scarti e della suscettibilità ad altre infezioni. Per questi motivi, il controllo dell'infezione da PCV2 è una priorità a livello internazionale. Negli ultimi anni, la disponibilità di vaccini sicuri ed efficaci ha permesso di ridurre l'incidenza e la gravità delle forme cliniche, in particolare della PMWS, di incrementare la produttività degli animali in accrescimento e migliorare i parametri produttivi delle scrofe. Tuttavia, nonostante i successi della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2, ed il virus continua a circolare anche nelle aziende che usano piani di profilassi indiretta. I vaccini attualmente disponibili non sono infatti in grado di prevenire le infezioni subcliniche che rappresentano attualmente il problema sanitario principale. Anche in assenza di forme cliniche, l'infezione da PCV2 causa alterata funzione delle cellule produttrici di interferone naturale (NIPC) e conseguente riduzione della produzione di TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  e ripercussioni sulla funzione linfocitaria. La modificazione dell'equilibrio tra citochine pro-infiammatorie, pro-immuni e regolatorie che si concretizza nella sovraregolazione dell'IL-10 e sottoregolazione di IFN- $\gamma$ , provoca inefficiente innesco di una adeguata risposta pro-infiammatoria innata, compromissione del riconoscimento delle infezioni virali e batteriche e compromissione delle risposte specifiche delle cellule T e B. A causa di questa particolare interazione tra PCV2 e sistema immunitario, che esita in una forte compromissione delle difese innate e adattative, le infezioni subcliniche possono essere responsabili di gravi conseguenze economiche. Tale compromissione delle difese innate e adattative spiega inoltre il ruolo svolto da PCV2 nelle coinfezioni. La vaccinazione anti-PCV2 può quindi, indirettamente, migliorare lo stato sanitario anche nei confronti di altri agenti patogeni riducendo, ad esempio, l'incidenza del complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC). Inoltre, nelle aziende in cui vi è la contemporanea circolazione di PCV2 e PRRSV, la vaccinazione contro PCV2 aumenta l'efficacia del vaccino anti-PRRSV. Lo studio e la comprensione dell'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e dei meccanismi alla base dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva, sono i necessari presupposti per la sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali. L'obiettivo per il prossimo futuro sarà quello di rendere disponibili dei vaccini che siano in grado di ridurre non solo l'espressione clinica delle PCVD ma che possano garantire anche una significativa riduzione della prevalenza di infezioni subcliniche, aprendo così la strada alla concreta possibilità di eradicazione di PCV2 dalle aziende suinicole.

## PAROLE CHIAVE

Suino; PCV2; PCVD; sistema immunitario; vaccinazione.

## INTRODUZIONE

L'infezione da PCV2 è associata a numerose manifestazioni patologiche del suino denominate, nel loro complesso, *porcine circovirus diseases* (PCVD). Le PCVD (Figura 1) possono essere classificate in forme sistemiche, quali la sindrome del deperimento post-svezzamento (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS) o in forme localizzate quali enterite granulomatosa, sindrome dermatite-nefrite (*porcine dermatitis and nephropathy syndrome* - PDNS), forme respiratorie riconducibili alla *porcine respiratory disease complex* (PRDC), polmonite proliferativa e necrotizzante (*proliferative and necrotising pneumonia* - PNP) e di-

sordini riproduttivi caratterizzati da aborti e da interruzioni precoci della gravidanza<sup>1</sup>. La PMWS, che rappresenta la forma clinica maggiormente conosciuta tra le PCVD è diventata, nel corso degli anni, un significativo problema sanitario ed economico per l'industria suinicola a livello mondiale<sup>1</sup>. La PMWS interessa principalmente i suinetti tra le 5 e le 15 settimane di età ed è caratterizzata da ritardi di accrescimento, dispnea, linfadenomegalia dei linfonodi inguinali superficiali. PCV2 è costantemente rilevato in vari organi e tessuti dei suini con PMWS ed è costantemente presente nelle lesioni microscopiche tipiche della PMWS. Tuttavia, l'infezione da PCV2 non necessariamente causa patologie cliniche e anticorpi specifici anti-PCV2 sono stati rilevati in un'alta percentuale di sieri suini in tutto il mondo<sup>2</sup>. L'infezione subclinica è quindi un evento frequente e può comunque causare ripercussioni negative sull'economia dell'allevamento provocando un aumento del numero di scarti, della percentuale di animali sottopeso e ri-

Corresponding Author:  
Giuseppe Sarli (giuseppe.sarli@unibo.it).

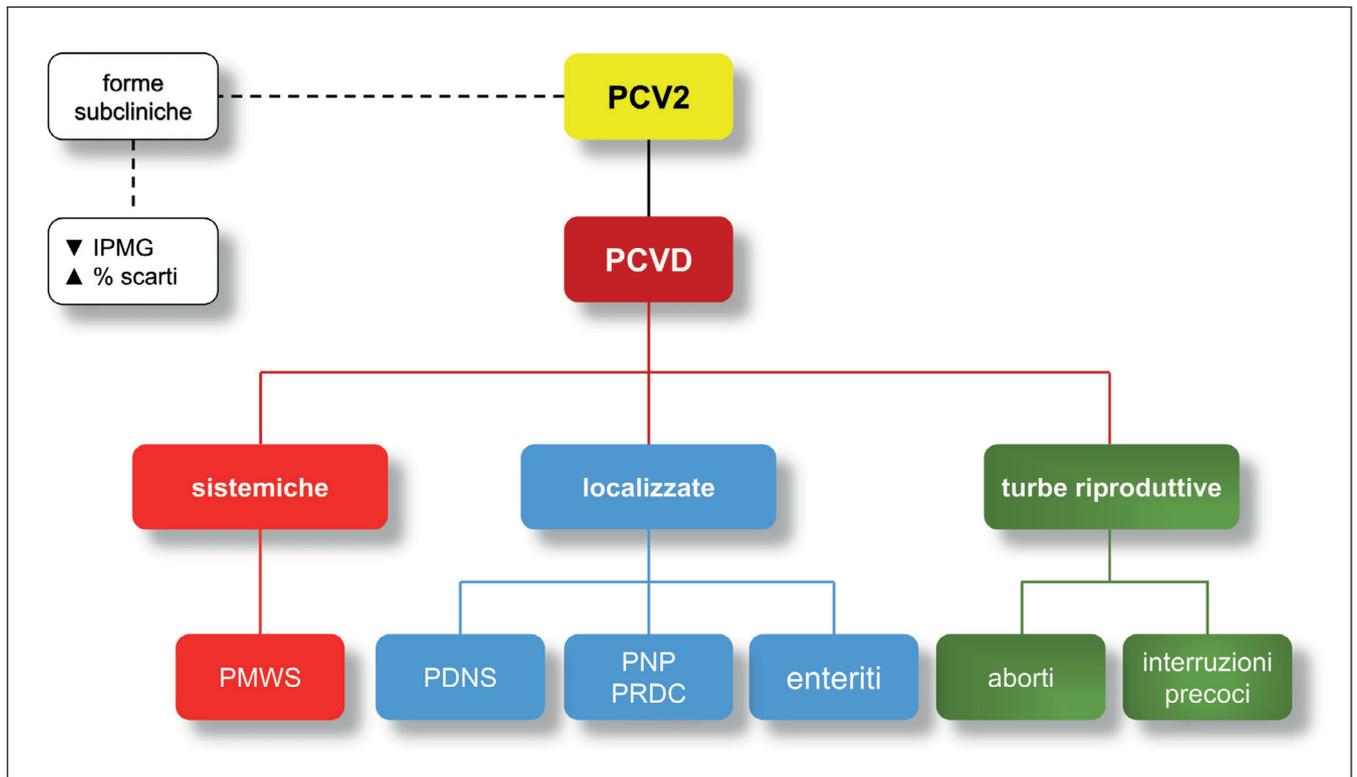


Figura 1 - Rappresentazione schematica delle *porcine circovirus diseases* (PCVD).



Figura 2 - L'eterogeneità dell'accrescimento nei gruppi, con aumento del numero dei soggetti sottopeso, può essere uno dei sintomi di infezione subclinica da PCV2.

ducendo gli incrementi ponderali<sup>1</sup> (Figura 2). Anche se i postulati di Koch sono stati soddisfatti per quanto riguarda la relazione tra PCV2 e PMWS, è difficile riprodurre sperimentalmente la grave espressione clinica della malattia che si osserva in situazioni di campo<sup>3</sup>. In maniera analoga, anche la valutazione sperimentale delle possibili conseguenze sanitarie e/o economiche di forme subcliniche di infezione risulta difficile da realizzare. Tutto ciò rappresenta un limite alle valutazioni di efficacia dei vaccini che si basano generalmente anche sulla stima della riduzione di incidenza delle forme cliniche. PCV2 è considerato uno dei patogeni virali economicamente più importanti in tutti i Paesi maggiori produttori di suini. Di conseguenza, il controllo delle infezioni da PCV2 è una priorità a livello internazionale e numerose strategie di management, corretta gestione delle condizioni ambientali dell'allevamento e vaccinali sono at-

tualmente impiegate per ottenere il controllo delle forme cliniche e per ridurre la prevalenza di infezione. Tra i diversi metodi di profilassi, la vaccinazione è diventata uno strumento di primaria importanza. A partire dal 2004, in Europa e dal 2006 negli USA, sono stati commercializzati numerosi vaccini per la prevenzione delle PCVD e tutti sono allestiti con ceppi appartenenti al genotipo PCV2a, il genotipo prevalente fino ai primi anni 2000 e progressivamente sostituito dal genotipo PCV2b. Nel corso degli anni sono stati identificati, anche retrospettivamente, 4 ulteriori genotipi (c-f) di importanza clinica inferiore e/o con una circolazione limitata solo ad alcuni Paesi.

Prove di *challenge*<sup>4</sup> hanno dimostrato che la vaccinazione riduce sensibilmente sia l'entità e la durata della viremia, sia l'entità e la durata dell'escrezione virale per via nasale o fecale, con il risultato di ridurre la carica virale nell'ambiente e

quindi il rischio di trasmissione dell'infezione. In condizioni di campo, tutti i vaccini anti-PCV2 attualmente disponibili sono inoltre in grado di ridurre la mortalità e la percentuale di scarti e migliorano significativamente l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG)<sup>5-9</sup>.

Nonostante i successi della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2: i vaccini attualmente disponibili non inducono un'immunità proteggente nei confronti dell'infezione e il virus continua a circolare anche nelle aziende che praticano la vaccinazione. In condizioni di campo il problema che rimane è quindi quello dell'insorgenza di infezioni subcliniche che possono causare, oltre alla riduzione delle *performances* produttive, anche immunodepressione.

Uno dei potenziali limiti dei vaccini commerciali è riconducibile alla diversità genetica tra i ceppi di PCV2 con cui sono stati allestiti e quelli attualmente circolanti nelle popolazioni suine, che fanno ipotizzare una possibile fuga immunitaria indotta dal vaccino. Allo stesso modo, la diversa formulazione dei vaccini disponibili rende complessa una valutazione omogenea della loro efficacia, laddove si riscontrano differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini registrati per l'uso sui suinetti.

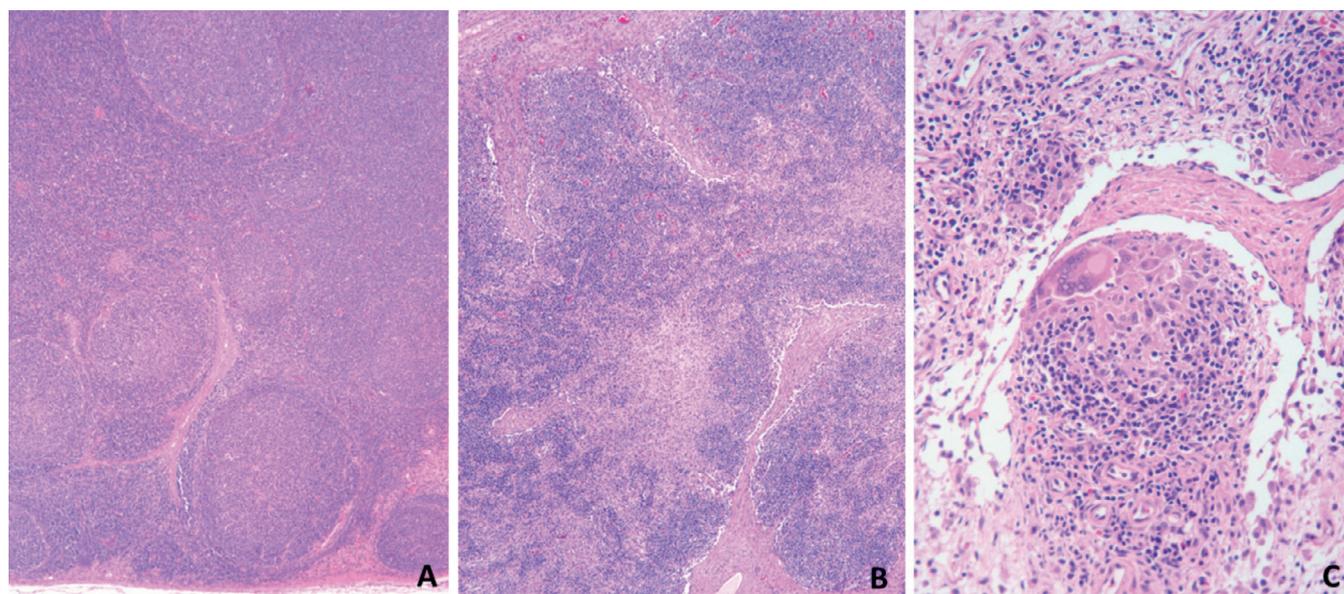
A causa delle modalità di trasmissione di PCV2 e della dinamica di popolazione delle aziende suinicole, che continuamente rinnovano il pool della popolazione sensibile attraverso movimentazioni di animali tra i diversi compartimenti, PCV2 è in grado di essere mantenuto in allevamento per anni senza necessità di reintroduzione. La vaccinazione intensiva rimane quindi uno strumento fondamentale per il controllo delle PCVD, contribuendo alla riduzione della frequenza di infezione, migliorando i parametri produttivi e conferendo indirettamente protezione anche nei confronti di altri agenti patogeni: l'effetto immunosoppressivo di PCV2 causa infatti una forte soppressione della funzionalità di base dei meccanismi di difesa innata predisponendo a superinfezioni secondarie e opportunistiche.

In questa *review* vengono sintetizzate le conoscenze relative all'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e su come questa possa influenzare la risposta vaccinale nei confronti di PCV2 o di altri patogeni del suino. Vengono inoltre discusse le modificazioni, nel tempo, delle forme di PCVD confrontando la situazione precedente all'introduzione della vaccinazione con quella attuale che ne prevede l'impiego.

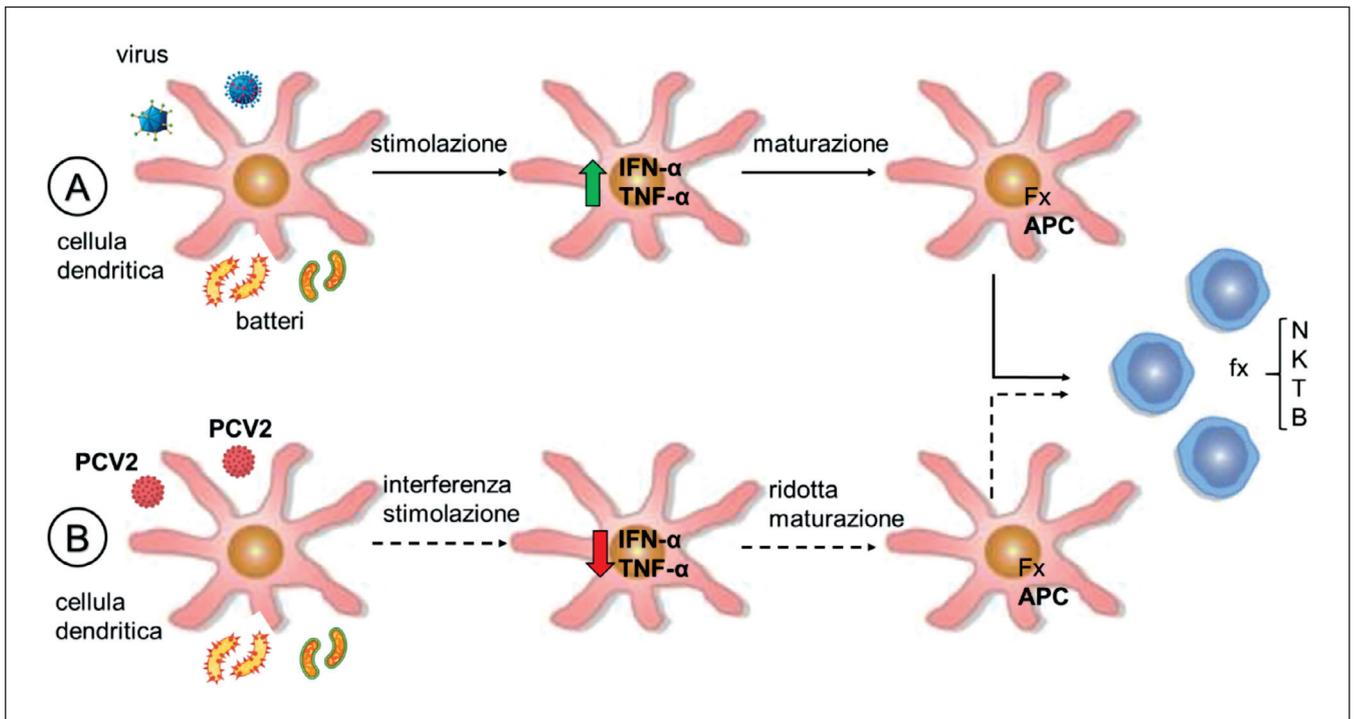
## PATOGENESI DELL'IMMUNODEFICIENZA INDOTTA DA PCV2

Gli organi target di PCV2 sono i tessuti linfoidei, in cui la replicazione del virus può portare all'atrofia follicolare con conseguente deplezione linfoide e sostituzione con cellule istiocitarie, e conseguente effetto immunosoppressore<sup>10</sup> (Figura 3). Studi istologici, condotti mediante tecniche immunostochimiche per classificare i diversi fenotipi cellulari presenti a livello di tessuti linfoidei e verificare le variazioni nel meccanismo patogenetico dell'immunosoppressione da PCV2, hanno evidenziato che i cambiamenti più rilevanti sono rappresentati da: riduzione dei linfociti B e T, aumento del numero dei macrofagi e perdita parziale e redistribuzione delle cellule presentanti l'antigene (APC)<sup>11</sup>.

Le APC, in particolare le cellule dendritiche (Figura 4), giocano un ruolo chiave nella risposta immunitaria innata e adattativa. Le cellule dendritiche interdigitanti, site nei diversi tessuti dell'organismo, esprimono recettori di superficie in grado di riconoscere la presenza di agenti patogeni e rispondere mediante la produzione ed il rilascio di citochine antivirali come l'interferone tipo 1. Inoltre, migrano nella regione T-dipendente dei tessuti linfoidei dove presentano l'antigene alle cellule T, inducendone l'attivazione. Nei centri germinali dei tessuti linfoidei sono invece presenti le cellule dendritiche follicolari, in grado di fagocitare gli antigeni circolanti e di presentarli ai linfociti B, determinandone l'attivazione e, di conseguenza, lo sviluppo dell'immunità umorale.



**Figura 3** - In (A) linfonodo normostrutturato con follicoli reattivi e tessuto interfollicolare entrambi ben popolati di linfociti. La deplezione linfocitaria (B) con scomparsa dei follicoli e riduzione numerica dei linfociti del tessuto interfollicolare è la base istologica della immunodeficienza in corso di PMWS. Lesioni specifiche granulomatose (C) insieme alla deplezione linfocitaria rappresentano un altro aspetto tipico della PMWS. (A) 5×; (B) 5×; (C) 20×.



**Figura 4** - Meccanismo cellulare dell'immunodeficienza indotta da PCV2.

Il meccanismo cellulare dell'immunodeficienza da PCV2 ha la sua massima espressione nella deplezione linfocitaria che origina a livello di cellule dendritiche (A), appartenenti al sistema immunitario e deputate, in risposta a stimoli antigenici di natura virale o batterica recepiti prevalentemente con il sistema dei recettori Toll-simili, a produrre citochine (TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ ) che, con meccanismo autocrino potenziano la propria funzione di presentazione degli antigeni ai linfociti di cui stimolano la funzione. (B) In corso di infezione da PCV2, il DNA virale interferisce con i recettori Toll-simili indebolendo il processo di maturazione della funzione di presentazione dell'antigene e, di conseguenza, la funzione dei linfociti.

Più di un meccanismo risulta quindi essere coinvolto nel determinare l'azione immunosoppressiva di PCV2. Nei compartimenti linfoidi si rileva una riduzione dell'abilità nella presentazione dell'antigene, espressa dalla riduzione nel numero delle cellule dendritiche follicolari e delle cellule interdigitanti, associata ad una riduzione della funzione delle cellule B e delle cellule T CD4+ (*T helper*) nelle fasi iniziale e intermedia di infezione. Nella fase finale si arriva ad avere una prevalenza della componente stromale<sup>12</sup>.

La deplezione delle cellule dendritiche follicolari nei suini colpiti da PMWS va di pari passo con la gravità della deplezione linfocitaria e con l'infiltrazione di macrofagi e cellule multinucleate a livello follicolare<sup>13</sup>.

Negli animali infetti da PCV2 è stata osservata anche una deplezione dei linfociti T CD8+ (linfociti T citotossici) e la quantità di DNA virale presente nei tessuti linfoidi, oltre a essere correlata alla deplezione linfocitaria nei tessuti, è correlata alla diminuzione di IgM+ e cellule CD8+ nel sangue periferico, a supporto dell'ipotesi che i soggetti infetti presentino una risposta immunitaria compromessa<sup>14</sup>. Il meccanismo coinvolto nella genesi della deplezione linfoide sembra essere associato ad una riduzione della proliferazione cellulare, più che ad un effettivo ruolo diretto di PCV2 nell'induzione di apoptosi delle cellule linfatiche<sup>15</sup>. Tuttavia, il meccanismo mediante il quale PCV2 determina tale deplezione e linfadenopatia deve ancora essere chiarito in modo definitivo<sup>10</sup>.

PCV2 è comunemente associato a cellule del lignaggio monocitico-macrofagico e alle cellule dendritiche (DC); queste cellule accumulano l'antigene ed il DNA virale per periodi prolungati in assenza di un'efficiente replicazione virale. Ciò suggerisce che tali cellule abbiano un ruolo importante nella

persistenza, diffusione e trasmissione virale<sup>16</sup>. Sperimentalmente, è stato osservato che PCV2 è in grado di infettare cellule di origine epiteliale, endoteliale e mieloide coltivate *in vitro*, e ciò spiega la diffusa distribuzione del virus nei diversi tessuti. Nelle cellule dendritiche di derivazione mieloide prevalgono processi endocitici, importanti per l'internalizzazione e l'accumulo delle proteine virali, mentre a livello di cellule endoteliali ed epiteliali avvengono processi di avvio del ciclo replicativo<sup>17</sup>.

La presenza di PCV2 nelle DC non influenza la funzionalità delle DC mieloidi, ma è stata osservata immunomodulazione delle DC plasmacitoidi (pDC). Le cellule dendritiche plasmacitoidi, anche denominate cellule produttrici di interferone naturale (NIPC), hanno un ruolo fondamentale nell'immunità innata e adattativa. Sono cellule "sentinella": avvertono la presenza di "intrusi" e modellano la forza, la durata e la qualità delle risposte delle cellule *natural killer* (NK), T e B. Le NIPC rispondono in modo efficiente e rapido alle infezioni producendo quantità particolarmente elevate di interferone di tipo 1 (IFN) attraverso il riconoscimento di componenti batteriche e virali tramite recettori di riconoscimento, compresi i recettori *toll-like* (TLR). Alcuni autori<sup>18,19</sup> hanno dimostrato che l'attività immunomodulatoria di PCV2 risulta essere mediata dall'interruzione della funzione delle NIPC attraverso l'interazione del DNA virale con i TLR endosomiali, con conseguente inibizione della produzione di IFN- $\alpha$  e del TNF- $\alpha$ , che dovrebbero essere prodotti dalle pDC. Ciò comprometterebbe la maturazione della DC mieloide associata e la successiva presentazione efficiente dell'antigene, con conseguenti importanti implicazioni per il riconoscimento dei segnali di pericolo virali e batterici. In stu-

di successivi, il DNA di PCV2 ha dimostrato di avere elevata capacità immunomodulatoria anche nei confronti delle stesse DC mieloidi interferendo con i processi endocitici, determinando quindi riduzione dell'efficienza di internalizzare le proteine virali PCV2-like<sup>20</sup>. In definitiva, le difese innate dipendenti da TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , come gli effetti antivirali diretti, la maturazione delle DC, l'attivazione delle cellule NK e la promozione di specifiche risposte delle cellule T e B, in caso di infezione da PCV2 sembra diventino inefficienti o inefficaci. Con l'incapacità delle NIPC di produrre IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , il funzionamento efficiente delle DC mieloidi si deteriorerebbe a causa del ruolo delle NIPC nel collegare l'immunità innata e quella adattativa<sup>19</sup>. La forte soppressione della funzionalità di base dei meccanismi di difesa innata è pienamente compatibile con l'osservazione di una maggiore frequenza di infezioni secondarie e opportunistiche nei suini colpiti da PMWS<sup>21</sup>.

In condizioni di campo, la sieroconversione avviene sia nei suini affetti da forme sistemiche sia in quelli che presentano infezione subclinica<sup>22</sup> ed è stato dimostrato sperimentalmente che una risposta umorale ritardata o bassi titoli anticorpali specifici sono correlati all'espressione della forma clinica<sup>23</sup>. Tuttavia, studi sperimentali e di campo hanno dimostrato che PCV2 può persistere nei tessuti e nel sangue anche in presenza di elevati titoli anticorpali, probabilmente a causa del fatto che non avviene una completa neutralizzazione del virus<sup>24</sup>. Questi risultati spiegherebbero la lunga persistenza di PCV2 nel sangue e nei tessuti nonostante la presenza di anticorpi specifici nel siero<sup>25</sup>. In condizioni sperimentali, anticorpi neutralizzanti (NA) sono rilevabili tra i 10 e i 28 giorni post infezione e la loro comparsa coincide con una diminuzione della carica virale sierica; titoli di NA bassi sono invece stati correlati all'aumento della replicazione di PCV2 e allo sviluppo di forme sistemiche. Tuttavia è stato osservato che non tutti i suini con basso titolo di NA hanno anche bassi livelli di anticorpi totali anti-PCV2<sup>26,27</sup>. Quest'evidenza suggerisce che alcuni animali possano sviluppare una risposta umorale priva di NA o che gli NA vengano prodotti più tardi. Probabilmente la sola presenza di anticorpi non garantisce completamente la *clearance* virale e nel controllo dell'infezione gioca un ruolo importante anche la risposta immunitaria cellulo-mediata<sup>25</sup>. Nei casi naturali di infezione da PCV2 si ritiene che la *clearance* virale sia mediata dalla combinazione tra presenza di NA e immunità cellulo-mediata. La differenza immunologica maggiore tra suinetti sintomatici e animali con infezione subclinica è la bassa o ritardata produzione di NA, insieme al riscontro di alti livelli di IL-10 e ridotta produzione di IFN- $\gamma$  nei soggetti che presentano i segni clinici della malattia<sup>21,28</sup>.

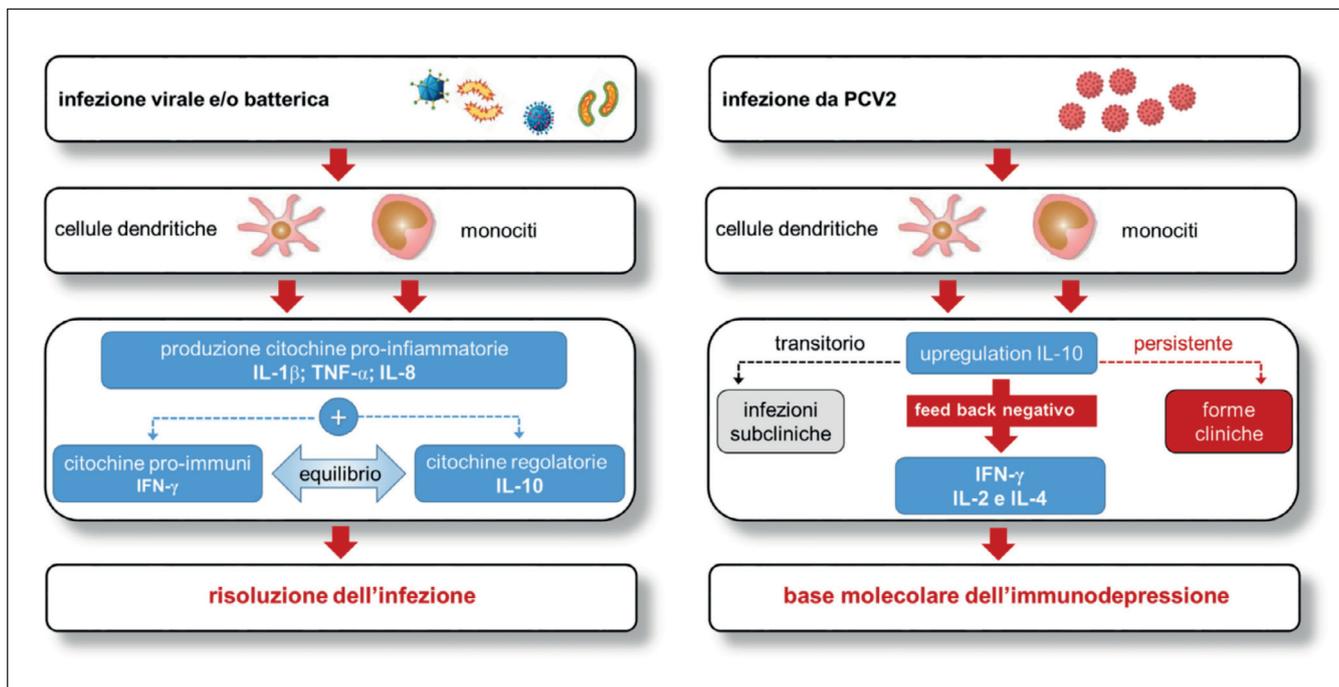
Per la risoluzione efficace di un'infezione è necessaria l'attivazione efficiente dell'immunità innata/infiammatoria e acquisita per bloccare la replicazione e l'invasione degli agenti patogeni, nonché per promuovere la *clearance* dei patogeni e/o delle cellule infette. La produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-8) e l'equilibrio tra citochine pro-immuni (IFN- $\gamma$ ) e regolatorie (IL-10) svolgono un ruolo fondamentale nell'innescare la risposta innata, così come nell'innescare e coordinare la risposta immunitaria adattativa<sup>29</sup>. Da numerosi studi è emerso che l'infezione da PCV2 altera in modo significativo le risposte delle citochine nei suini infetti: la citochina IL-10 è sovraregolata, mentre l'espressione di IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  è sottoregolata nei suini che ma-

nifestano PCVD, indicando un pattern alterato di risposta dei linfociti<sup>6,21</sup>. IL-10 è una citochina regolatoria considerata un mediatore immunosoppressivo e antinfiammatorio. Inibisce la funzione dei macrofagi e può inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie come IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ . Durante l'infezione da PCV2 e in corso di PCVD, IL-10 è secreta principalmente da macrofagi-monociti e cellule dendritiche, ma anche da cloni di cellule T, che sono stati alterati dalla stimolazione prolungata dell'antigene<sup>30</sup>. Suini con forme subcliniche sviluppano un aumento transitorio della risposta IL-10 durante il picco della viremia; al contrario, è dimostrato che negli animali con forme cliniche questa citochina predomina ancora nelle fasi successive. Sembra quindi che la risoluzione dell'infezione da PCV2 sia correlata al cessare delle risposte IL-10 specifiche, che coincide con l'inversione del rapporto IgM/IgG<sup>31</sup>. L'immunosoppressione mediata dall'IL-10 sembra quindi avere un ruolo importante nella patogenesi e nel mantenimento dell'infezione naturale da PCV2<sup>21</sup> (Figura 5).

Nel corso di studi *in vitro* da campioni di sangue eparinizzato per l'isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), è stata riscontrata, in concomitanza all'aumento dell'IL-10, una sovraespressione dell'mRNA di molecole immunomodulatorie PD-L 1 e 2 (*programmed death domain ligands*). Questo potrebbe essere alla base di una risposta inefficace delle cellule T, causando una diminuita risposta cellulo-mediata con conseguente aumento della gravità della malattia osservata negli animali con PCVD<sup>32,33</sup>. L'attivazione dell'immunità cellulo-mediata, compresa la produzione di IFN- $\gamma$  si è dimostrata necessaria per il controllo dell'infezione da PCV2<sup>34,35</sup>; i suini che non producono livelli sufficienti di IFN- $\gamma$  presentano livelli più bassi di NA e livelli più elevati di viremia associati a forme cliniche<sup>35</sup>. L'ipotesi relativa all'importanza dello sviluppo di un'immunità cellulo-mediata protettiva deriva anche da dati di confronto tra animali vaccinati e animali affetti da PMWS: gli animali con PMWS non sono in grado di innescare un'efficace risposta pro-infiammatoria innata per far fronte all'infezione, come dimostrato dai bassi livelli di citochine pro-infiammatorie IFN- $\gamma$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1b, che si mostrano invece aumentate negli animali vaccinati<sup>28,29</sup>.

L'immunodepressione causata da PCV2, combinata con l'influenza della natura cronica dell'infezione che va ad inficiare l'efficienza immunitaria degli animali infetti, può influenzare le risposte all'immunizzazione e la gravità delle coinfezioni<sup>1</sup>. L'infezione con il solo PCV2 raramente evolve in malattia clinica; lo sviluppo di PCVD è spesso accelerato nell'insorgenza, potenziato in gravità e prolungato nella durata da infezioni virali o batteriche concomitanti: le coinfezioni possono promuovere l'infezione da PCV2 aumentandone la replicazione nei tessuti e l'accumulo nelle cellule del sistema immunitario dell'ospite<sup>36</sup>.

Dopo le prime coinfezioni sperimentali con altri comuni patogeni suini, è stato dimostrato che, oltre all'immunosoppressione, anche l'immunostimolazione può innescare la progressione dell'infezione fino alla comparsa di malattia e lesioni caratteristiche. L'inoculazione di suinetti gnotobiotici con PCV2 associato ad immunostimolazione con emocianina e adiuvante incompleto di Freund ha consentito la riproduzione sperimentale della PMWS<sup>37</sup>. A seguito dei risultati di questo lavoro, si è sviluppata una notevole preoccupazione sul potenziale effetto sinergico dei vaccini adiuvati nei con-



**Figura 5** - Evoluzione della normale risposta infiammatoria post infezione e meccanismo dell'immunodepressione a seguito di infezione da PCV2.

**A sinistra:** cocktail citochinico alla base della risoluzione positiva della risposta infiammatoria ad una infezione virale o batterica che avviene grazie ad una produzione di citochine pro-infiammatorie e ad una equilibrata sintesi di citochine che esaltano la risposta immunitaria (IFN- $\gamma$ ) e quelle ad effetto regolatorio-anti infiammatorio e immunosoppressivo come l'IL-10.

**A destra:** situazione che si realizza in caso di infezione da PCV2 nel corso della quale è centrale l'upregulation della citochina IL-10 (evento transitorio nelle infezioni subcliniche, e persistente nelle forme cliniche di PCVD) che riduce la produzione di citochine ad effetto trofico positivo sulle cellule implicate nella risposta immune.

fronti dell'infezione da PCV2. Per verificare questa ipotesi, è stato condotto uno studio per determinare se e quali tra gli adiuvanti presenti nei vaccini commerciali potessero indurre una maggiore replicazione di PCV2 e un'augmentata incidenza di PCVD. In questo studio i suinetti sono stati vaccinati a 4 e 6 settimane d'età ed infettati con PCV2 a 6 settimane d'età. In condizioni sperimentali, è stato rilevato che a 35 giorni post infezione, i suini ai quali è stato somministrato un vaccino adiuvato olio-in-acqua presentavano una maggiore durata della viremia, maggiore quantità di PCV2 nel siero e nei tessuti e un aumento della gravità della deplezione linfoide rispetto ai suini ai quali era stato somministrato un vaccino adiuvato con carbopol in soluzione acquosa e con idrossido d'alluminio<sup>38</sup>.

## INFEZIONE DA PCV2 PRIMA DELLA PROFILASSI VACCINALE

PCV2 è un virus ubiquitario, che causa un'infezione persistente<sup>2</sup> e viene costantemente rilevato in secreti ed escreti a seguito di infezione naturale o sperimentale. Sia le aziende colpite da PMWS che quelle non colpite presentano un tasso d'infezione e di sieroconversione simile<sup>39</sup>.

PCV2 si diffonde rapidamente, per via orizzontale e verticale, all'interno della popolazione suina. Il contatto diretto è la modalità di trasmissione più efficace a causa dell'esposizione contemporanea dei suini recettivi alle secrezioni respiratorie, alla saliva, feci e urina contaminate. La trasmissione tra aziende avviene mediante l'introduzione di animali vivi o prodotti (es. sperma) infetti. A causa delle numerose vie di

trasmissione e del continuo *turnover* della popolazione recettiva, l'infezione viene mantenuta in allevamento per anni<sup>40</sup>. È stato inoltre chiaramente messo in evidenza che la coinfezione con *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) causa una maggiore durata e quantità di eliminazione di PCV2, determinando una maggiore contaminazione dell'ambiente con un conseguente aumento del rischio di infezione<sup>41</sup>.

PCV2 è resistente alle alte temperature e ad ampie variazioni di pH, mantenendosi quindi stabile per lungo tempo nelle condizioni ambientali di allevamento<sup>40</sup>. L'assenza dell'*envelope* lo rende resistente ai solventi dei lipidi, ma viene inattivato da disinfettanti alcalini (idrossido di sodio), agenti ossidanti (ipoclorito di sodio) e dai sali quaternari d'ammonio<sup>42</sup>.

Le pratiche di gestione possono influenzare le dinamiche d'infezione, come dimostrato anche da un approccio modellistico<sup>43</sup>. In particolare, maggiori dimensioni dei box nella *nursery* e l'intensità della pratica del *cross-fostering* possono modificare l'epidemiologia dell'infezione favorendo infezioni precoci, che più probabilmente provocano manifestazioni cliniche sistemiche di PCVD. Rilevante anche la dimostrazione di una associazione tra aumento della percentuale di dosi di sperma infetto e aumento del rischio di infezioni precoci<sup>43</sup>. Quest'ultima osservazione è compatibile con la messa in evidenza che l'utilizzo di sperma di origine aziendale aumenta il rischio di infezione. Sebbene la presenza di PCV2 nello sperma non costituisca una prova definitiva della possibilità di trasmissione venerea, i centri per la produzione di materiale seminale dovrebbero essere indenni dai principali patogeni, tra cui PCV2<sup>44</sup>.

## PROFILI IMMUNITARI DOPO L'IMPLEMENTAZIONE DELLA PROFILASSI VACCINALE

Prima dell'introduzione della profilassi vaccinale, il controllo delle PCVD si limitava principalmente al miglioramento delle strategie di gestione dell'allevamento e al controllo delle coinfezioni. La vaccinazione è ora invece uno strumento importante per il controllo dell'infezione da PCV2<sup>45</sup>.

La disponibilità commerciale di vaccini anti-PCV2 risale al 2004 in Europa e al 2006 in Nord America e tali prodotti sono oggi disponibili in tutto il mondo<sup>46</sup>. La diminuzione dell'incidenza ed il miglioramento dell'efficienza produttiva dopo l'adozione della vaccinazione, hanno chiaramente fatto emergere le conseguenze negative che l'infezione da PCV2 ha sulla salute e sulla produttività dei suini<sup>47</sup>. Infatti, oltre a ridurre la mortalità associata alle forme sistemiche di PCVD, l'introduzione della vaccinazione ha determinato un incremento della produttività anche nelle aziende non colpite da PMWS o, in quelle colpite, ha condizionato l'aumento delle produzioni oltre i livelli presenti prima che segni clinici di PMWS apparissero in allevamento. Questi miglioramenti economici e sanitari hanno reso evidente l'esistenza di forme subcliniche d'infezione (PCV2-SI), condizioni in cui i suinetti clinicamente sani, presentano una riduzione degli IPMG e sono maggiormente recettivi ad altri patogeni. Queste forme condizionano negativamente l'economia aziendale, contribuendo inoltre all'aumento della mortalità nel periodo post-svezzamento<sup>48</sup>.

La profilassi vaccinale si basa sull'impiego di prodotti diversi nella loro formulazione: il primo vaccino immesso in commercio è stato allestito da un ceppo di PCV2a inattivato ed è registrato per l'uso su suinetti di età superiore alle tre settimane di vita e sulle scrofe. In seguito, sono stati commercializzati vaccini ricombinanti a subunità basati sulla proteina del capsido virale di PCV2a espressa in un sistema di baculovirus<sup>49</sup>. Un ulteriore vaccino, registrato per l'immunizzazione di suinetti oltre le tre settimane di vita, è allestito con un virus PCV1/PCV2 chimerico inattivato<sup>48,49</sup>.

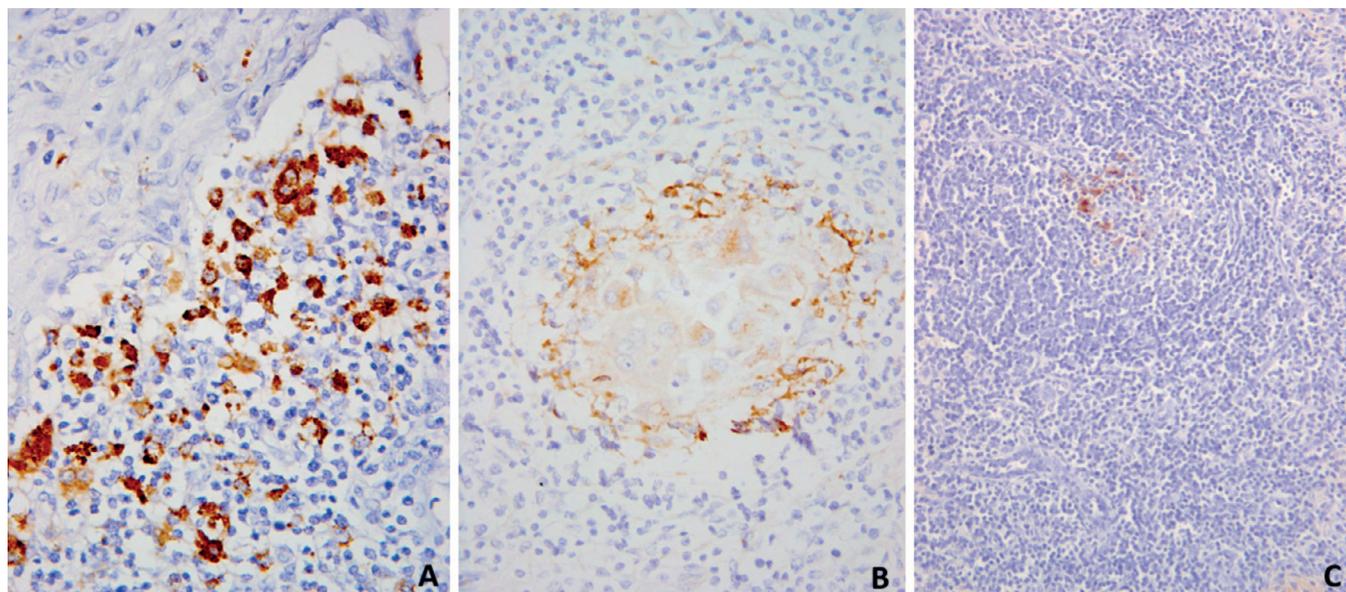
La valutazione dell'efficacia dei vaccini anti-PCV2 è basata sugli stessi criteri utilizzati per la diagnosi di PMWS: presenza dei segni clinici di malattia, presenza di lesioni microscopiche caratteristiche e presenza di PCV2 nelle lesioni a cui si aggiunge la determinazione della carica virale nel siero in associazione ai segni clinici<sup>45</sup> (Figura 6).

I vaccini commerciali si sono dimostrati molto efficaci nel ridurre i segni clinici di malattia e nel migliorare l'IPMG dei suinetti, con conseguente miglioramento degli indici economici aziendali<sup>28,45</sup>. Sono inoltre in grado di abbassare la percentuale di suini viremici, il livello di viremia, la carica virale in tamponi nasali e fecali<sup>4</sup>, riducendo l'escrezione virale e, di conseguenza, il rischio di trasmissione anche in condizioni di campo<sup>45,50</sup>.

Dal momento che la carica virale sierica ridotta e la diminuita presenza di PCV2 negli organi target, determinate con tecniche di biologia molecolare, sono fortemente correlate a bassi punteggi istopatologici nei tessuti linfoidi, ne deriva che l'impiego di vaccini in grado di ridurre la quantità di PCV2 nel siero e nei linfonodi determina di conseguenza anche una riduzione della gravità delle lesioni istologiche<sup>7</sup>.

I risultati di uno studio condotto in USA riportano che a 6 anni dall'introduzione della vaccinazione, avvenuta a partire dal 2006, è stata ottenuta una riduzione della prevalenza di animali viremici e dei livelli di viremia, un aumento degli allevamenti negativi a PCV2 e la diminuzione della prevalenza di suini sieropositivi a seguito di infezione naturale<sup>51</sup>.

La protezione dei suinetti può essere ottenuta mediante un'immunizzazione attiva o passiva (vaccinando le scrofe) o dalla combinazione delle due strategie<sup>45</sup>. Sperimentalmente è stato dimostrato che i suinetti con elevati livelli di anticorpi passivi presentano una riduzione della carica virale sierica inversamente correlata al titolo anticorpale<sup>52</sup>. L'immunità passiva di origine materna gioca un ruolo importante nella prevenzione della PMWS. Tuttavia, il rilevamento del genoma o dell'antigene virale nei tessuti anche dopo il trasferimento dell'immunità passiva indica che gli anticorpi di derivazione materna non sono sempre in grado di prevenire l'in-



**Figura 6** - In (A) abbondante antigene virale in cellule istiocitarie in corso di deplezione linfoide in un caso di PMWS. (B) antigene virale presente sia in cellule istiocitarie che in macrofagi epitelioidi in un granuloma linfonodale. (C) linfonodo normostrutturato con bassa carica virale al centro di un follicolo; il metodo rappresenta la stima indiretta della carica virale residua in risposta all'efficacia della vaccinazione. Reazione immunostochimica per PCV2 con anticorpo monoclonale F217. (A) 40x; (B) 40x; (C) 20x.

fezione. La persistenza di PCV2 nei tessuti è anch'essa correlata al titolo degli anticorpi di derivazione materna ancora presenti al momento dell'infezione<sup>52</sup>. La vaccinazione delle scrofe esposte naturalmente al virus riduce anche la quantità di PCV2 trasmessa ai suinetti attraverso il colostro, pur non eliminando la diffusione virale attraverso questa via<sup>9</sup>. Sebbene PCV2 sia trasmesso dalle scrofe ai suinetti tramite il colostro, i suinetti nati da madri vaccinate si presentano non viremici allo svezzamento; pertanto gli anticorpi neutralizzanti di derivazione materna sembrano essere in grado di controllare l'infezione nelle fasi iniziali della vita dell'animale<sup>53</sup>. In condizioni di campo, la vaccinazione delle scrofe è in grado di migliorare anche i parametri produttivi dei suinetti. In un allevamento con numerosi casi di PMWS acuta, la vaccinazione delle sole scrofe ha consentito il raggiungimento del peso di macellazione in periodi di tempo più brevi e ha ridotto la mortalità pre-svezzamento, portandola a percentuali inferiori rispetto a quelle registrate prima del focolaio<sup>54</sup>. La vaccinazione delle scrofe è efficace anche nelle condizioni di infezione subclinica, determinando un aumento dell'IPMG con conseguente riduzione della durata della fase d'ingrasso<sup>8</sup>.

L'applicazione di protocolli vaccinali anti-PCV2 a lungo termine sulle scrofe, in allevamenti con problemi riproduttivi, influenza positivamente anche altri parametri quali: tasso di inseminazione, numero di suinetti nati vivi e svezzati per parto e peso corporeo alla nascita<sup>55</sup>. Inoltre, la vaccinazione delle scrofe ha un ruolo protettivo nei confronti dei problemi riproduttivi associati a PCV2<sup>56</sup>.

La vaccinazione di entrambe le categorie produttive (scrofe e suinetti a 21 giorni d'età), determina una riduzione dei livelli di viremia e della quantità di antigene virale a livello di tessuti linfoidi maggiore rispetto che la sola vaccinazione delle scrofe<sup>57</sup>.

Studi sperimentali e di campo hanno suggerito che la presenza di elevate quantità di anticorpi di derivazione materna possa influenzare l'efficacia della vaccinazione, sia in termini di risposta immunitaria umorale indotta da vaccino sia in termini di IPMG<sup>58</sup>. Relativamente alla risposta immunitaria umorale, è stato dimostrato che alti titoli anticorpali al momento della vaccinazione condizionano negativamente la sierconversione post-vaccinale, nonché lo sviluppo di una efficace risposta cellulo-mediata, influenzando negativamente lo sviluppo dell'immunità attiva nei confronti del virus. Alcuni autori ritengono che la vaccinazione di suinetti con immunità passiva a 49 giorni di vita (piuttosto che a 21) potrebbe essere più efficace per il controllo dell'infezione, in particolare se questa si verifica durante il periodo dell'accrescimento<sup>59</sup>. Posticipare l'intervento vaccinale ha conseguenze trascurabili sull'IPMG<sup>58</sup>.

Il declino degli anticorpi passivi rende gli animali recettivi all'infezione, con conseguente sierconversione attiva<sup>22</sup>. Lo scopo dello stimolare l'immunità dei suinetti mediante la vaccinazione è quella di fornire protezione contro l'infezione da PCV2, riducendo incidenza e gravità delle forme cliniche e subcliniche di PCVD<sup>25</sup>.

La valutazione morfologica dell'estensione della presenza dell'antigene virale, eseguita mediante tecniche di immunohistochimica (IHC) ed ibridazione *in situ* (ISH), e della deplezione linfoide nei linfonodi, sono criteri critici nella valutazione dell'efficacia dei vaccini anti-PCV2 in quanto queste caratteristiche sono fondamentali per la diagnosi di PCVD (Figura 6). In studi di valutazione dell'efficacia dei vaccini da

utilizzare sui suinetti<sup>60</sup>, entrambi questi parametri (deplezione linfoide e deposizione dell'antigene a livello di tessuti linfoidi) sono risultati ridotti dopo l'impiego della vaccinazione e successivo *challenge* con PCV2b<sup>34</sup>.

Alla luce del ruolo svolto da PCV2 nelle coinfezioni, si ritiene che la vaccinazione anti-PCV2 possa indirettamente conferire protezione anche nei confronti di altri agenti patogeni, come nel caso della prevenzione del complesso delle malattie respiratorie del suino<sup>61</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato la relazione tra PCV2 e PRRSV, e come la presenza di PRRSV possa aggravare le lesioni associate a PCV2 e aumentare il livello di presenza dell'antigene PCV2 nei tessuti<sup>62</sup>, in particolare nella coinfezione con PRRSV tipo 2<sup>63</sup>.

È stato dimostrato che, in presenza di circolazione di PRRSV, la vaccinazione anti-PCV2 riduce significativamente la gravità delle lesioni polmonari e linfoidi associate a PCV2 e la probabilità di rilevare gli antigeni di PCV2 nei tessuti<sup>62,64</sup>. Sempre in presenza di circolazione di PRRSV, la mancata vaccinazione anti-PCV2 riduce l'efficacia della vaccinazione nei confronti di PRRSV<sup>64</sup>.

Ne consegue che nelle aziende in cui è presente coinfezione PCV2-PRRSV, la vaccinazione contro PCV2 è prioritaria, in quanto l'infezione da PCV2 riduce l'efficacia del vaccino anti-PRRSV<sup>61</sup>. Al contrario, la vaccinazione per PRRSV è giustificata dalla necessità di ridurre l'impatto negativo dell'infezione sullo stato di salute degli animali in termini di insorgenza di PCVD<sup>65</sup>. Una sperimentazione condotta in aziende con presenza di casi di PMWS definiti sulla base di criteri patologici accettati a livello internazionale (presenza di segni clinici, lesioni macroscopiche, reperti istopatologici e presenza di PCV2 nelle lesioni linfoidi), ha dimostrato il coinvolgimento di PRRSV nel determinismo del focolaio di PMWS. Lo studio condotto in campo ha inoltre valutato gli effetti delle vaccinazioni contro PRRSV e PCV2, in associazione o somministrati singolarmente, in termini di segni clinici, mortalità e IPMG rispetto a gruppi di suini non vaccinati. Lo studio ha dimostrato che la vaccinazione in associazione induce protezione nei confronti dello sviluppo di forme cliniche e, nonostante non riduca la viremia da PRRSV, riduce incidenza, mortalità, durata della viremia e carica virale di PCV2 e migliora le prestazioni produttive<sup>65</sup>.

Nelle aziende in cui prevale la coinfezione PCV2-*Mycoplasma hyopneumoniae*, è invece necessaria la vaccinazione nei confronti di entrambi i patogeni: in condizioni sperimentali<sup>66</sup>, è stato dimostrato che la sola vaccinazione nei confronti di PCV2 è efficace nel ridurre la viremia e le lesioni polmonari e linfoidi associate a PCV2, ma non è in grado di ridurre la gravità delle lesioni polmonari indotte da *M. hyopneumoniae* nei suini infetti da entrambi i patogeni, a causa dell'interazione indipendente tra i due vaccini e i due agenti eziologici<sup>61</sup>.

## INFLUENZA DELLA VACCINAZIONE SUL GENOTIPO DI PCV2 PREVALENTE

Nonostante in USA la copertura vaccinale sia quasi del 100%, il DNA di PCV2 può ancora essere rilevato nel 25% dei tessuti di suino esaminati, con una netta predominanza del genotipo PCV2d che, probabilmente, ha tratto vantaggio dalla pressione immunitaria vaccinale<sup>67</sup>.

Studi di genomica virale hanno evidenziato che tra i trascritti RNA specifici per PCV2, quattro sono tradotti in proteine con ruoli biologici rilevanti: ORF1, ORF2, ORF3 e ORF4. ORF1 codifica per le proteine Rep e Rep', necessarie per la replicazione del genoma virale; ORF2 codifica per la proteina Cap, principale proteina del capsido ed elemento immunogeno virale; ORF3 e ORF4, localizzate nella stessa regione di ORF1 ma nel filamento antisense, codificano per due proteine non strutturali coinvolte nella regolazione della replicazione virale e nell'apoptosi della cellula ospite<sup>68</sup>. Il genotipo PCV2d in particolare, differisce dagli altri genotipi per la presenza di un residuo di lisina extra all'estremità carbossi-terminale di Cap<sup>69</sup>.

La pressione immunitaria selettiva, sviluppata a seguito di infezione naturale o vaccinazione, ha un ruolo chiave nell'influenzare la possibilità che emergano nuove varianti e si diffondano nuovi genotipi di PCV2<sup>70</sup>. A causa del suo alto tasso di evoluzione, PCV2 può adattarsi rapidamente a pressioni selettive indotte dalla vaccinazione stessa. È già stato dimostrato che le popolazioni di PCV2 presenti nelle aziende in cui si pratica la vaccinazione differiscono nella composizione genomica del virus circolante, rispetto a quelle in cui non viene applicato un protocollo vaccinale. Nelle aziende che vaccinano da almeno due anni, si rileva la presenza di mutazioni a bassa frequenza che, sebbene non favorevoli per il *fitness* virale nel dato momento, possono andare a costituire mutanti con potenziale ruolo di *reservoir* che permettono un rapido adattamento del virus in caso di variazioni di condizioni ambientali, di cofattori, di dinamiche della popolazione ospite. Possono quindi verificarsi mutazioni inaspettate e vantaggiose per il virus che determinano l'aumento delle loro frequenze nella popolazione virale<sup>71</sup>. Allo stesso modo, alla luce dell'evidenza che nei genotipi PCV2a e PCV2b la variazione di un singolo aminoacido è stata in grado di abolire l'attività neutralizzante di un anticorpo monoclonale contro il genotipo 2b<sup>72</sup>, piccole variazioni cumulative nella proteina del capsido possono portare alla fuga immunitaria indotta da vaccino. L'attuale prevalenza di PCV2d potrebbe quindi riflettere la mancanza di una protezione immunologica completa da parte dei vaccini attuali contro questo genotipo<sup>46</sup>.

I principali vaccini commerciali disponibili sono allestiti a partire dal genotipo PCV2a o dalla sua proteina del capsido e sono efficaci nell'indurre immunità umorale e cellulo-mediata contro PCV2a<sup>46,73,74</sup>, ma sono anche in grado di controllare l'infezione da PCV2b<sup>4</sup>. Tuttavia, per quanto i vaccini anti-PCV2a generalmente prevengono la malattia clinica e riducono la prevalenza del genotipo 2a, potrebbero non ridurre la prevalenza di PCV2b. È stato infatti dimostrato che la vaccinazione omologa nei confronti del genotipo 2b riduce maggiormente la viremia rispetto al vaccino eterologo, anche in presenza di coinfezione PCV2a e PCV2b<sup>69</sup>. D'altro canto, studi di campo hanno rivelato, sulla base di dati clinici, virologici ed immunologici, l'efficacia dei vaccini-PCV2a nel conferire adeguata protezione nei confronti di coinfezioni PCV2b e PCV2d<sup>75</sup>. Sembra quindi che i vaccini attualmente disponibili siano adeguati nella prevenzione delle forme cliniche, ma potrebbero rappresentare una situazione definita come *leaky vaccines*. Infatti, al contrario di quelli *all-or-none* che riducono i tassi d'infezione a zero per una parte di soggetti, indipendentemente dal numero di esposizioni, i *leaky vaccines* tendono a ridurre la velocità di trasmissione e il tasso di infe-

zione ma sulla base della variabile del tasso di esposizione: non conferiscono protezione adeguata in condizioni di esposizione ripetuta e con influenza di altri cofattori<sup>46</sup>.

Nel genotipo PCV2d è stato riscontrato un aumento della diversità genetica nel tempo, tanto che gli isolati identificati di recente vengono oggi denominati PCV2d<sup>76</sup>. Per far fronte alla preoccupazione riguardo la possibilità di selezione di ceppi PCV2 sempre più geneticamente e antigenicamente divergenti, le strategie vaccinali vanno concentrandosi sull'ampliamento dello spettro di protezione del singolo vaccino, affinché sia garantita protezione anche nei confronti di genotipi emergenti come PCV2d, e nei confronti del predominante PCV2b. A questo scopo, alcuni autori<sup>77</sup> hanno mirato alla riproduzione molecolare del DNA virale mescolando i geni codificanti per le proteine del capsido di 5 sottotipi di PCV2 geneticamente diversi, al fine di creare un virus chimerico che potrebbe indurre un'ampia protezione crociata contro i diversi genotipi. In uno studio condotto *in vivo*, il virus chimerico PCV2-3cl14 ha dimostrato il più alto livello di cross neutralizzazione contro i diversi sottotipi; successivamente in uno studio di efficacia contro i ceppi PCV2b e PCV2d, è stato dimostrato che il vaccino costituito con il virus chimerico 3cl14 determina una riduzione significativa della quantità di DNA virale al picco della viremia, nonché una riduzione della presenza del virus nei tessuti linfoidi; inoltre le lesioni linfoidi sono risultate ridotte nei gruppi vaccinati successivamente esposti a PCV2b. La vaccinazione con virus chimerico ha quindi indotto un'immunità protettiva nei confronti di PCV2b e PCV2d<sup>77</sup>.

## VACCINI ANTI-PCV2 E TIPOLOGIA DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

La comparsa di segni clinici è efficacemente controllata dalla vaccinazione ma, in condizioni di campo, permane il problema rappresentato dall'insorgenza di infezioni subcliniche che possono potenzialmente causare effetti negativi quali la riduzione della risposta immunitaria sistemica, con ripercussioni sulla resistenza allo sviluppo di malattie. In uno studio condotto per determinare se la sola vaccinazione potesse essere sufficiente per eradicare PCV2 da un allevamento<sup>78</sup>, la vaccinazione ripetuta ha ridotto la presenza del virus ma non è stata in grado di eliminarla, e PCV2 è riemerso poco dopo la sospensione della vaccinazione. I vaccini sono quindi eccellenti per la profilassi ma quelli attualmente disponibili non sono protettivi nei confronti dell'infezione<sup>28</sup>.

La maggior parte dei suini presenta anticorpi specifici contro PCV2<sup>79</sup> e, in aziende in cui sono stati diagnosticati casi di PMWS, la sieroprevalenza è elevata, con concomitante viremia ed escrezione virale<sup>39</sup>. Tuttavia, i suini con PMWS presentano titoli inferiori di anticorpi neutralizzanti rispetto agli animali con infezione subclinica<sup>27</sup>. Sebbene importanti da un punto di vista immunitario, gli anticorpi neutralizzanti sono efficaci esclusivamente nei confronti del virus extracellulare e dell'antigene di superficie cellulare. Considerando tuttavia che PCV2 è un virus privo di *envelope* è improbabile che la sua proteina capsidica sia espressa sulla superficie delle cellule infette: le proteine virioniche potrebbero quindi non rappresentare un bersaglio per la difesa immunitaria mediata da anticorpi ma sarebbero necessari altri meccanismi citotossici<sup>80</sup>.

È stato dimostrato che la *clearance* virale coincide con la comparsa di cellule secernenti IFN- $\gamma$  (SC) specifiche per PCV2, prima della comparsa degli anticorpi neutralizzanti specifici<sup>34</sup>. Negli animali che resistono allo sviluppo della malattia si sviluppano risposte immunitarie mediate da cellule T CD4+ e CD8+<sup>80</sup>, dirette contro le proteine del capside Cap con produzione di IFN- $\gamma$ -SC, e contro la proteina replicasi Rep codificata dal gene ORF1<sup>81</sup>. Cap risulta essere un buon immunogeno per le cellule T, determinando una risposta IFN- $\gamma$ -SC maggiore; lo sviluppo di significative risposte IFN- $\gamma$  contro Rep sembra invece essere correlato al livello di replicazione del virus, essendo rilevato più frequentemente in suini con presenza di lesioni associate a PCV2 e con presenza di virus nel siero e nei tessuti<sup>81</sup>. L'induzione della risposta cellulo-mediata contro Cap potrebbe dunque essere di fondamentale importanza per evitare la persistenza virale nelle cellule del lignaggio monocitico-macrofagico; viceversa, poiché Rep è altamente espressa nelle cellule che supportano la replicazione di PCV2, le risposte cellulari dirette a Rep potrebbero essere importanti per limitare la replicazione del virus e prevenire la progressione dell'infezione verso la PMWS<sup>81</sup>.

In uno studio di infezione-vaccinazione controllato, l'analisi delle risposte delle cellule T antigene-specifiche contro PCV2, ha permesso di evidenziare che l'induzione di cellule T CD4+ coproduttori IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  da parte di un agente non replicativo, come l'antigene vaccinale, è associata ad un passaggio isotipico da IgM a IgG, ed esplica una funzione di supporto per la produzione di anticorpi. Contrariamente agli anticorpi specifici contro PCV2, queste cellule sono state indotte in tutti i suini vaccinati, che sono risultati protetti dalla viremia; ciò a supporto dell'ipotesi che queste cellule T produttrici di citochine svolgono un ruolo importante nella protezione nei confronti di PCV2<sup>82</sup>. È emerso inoltre che le cellule T di memoria specifica dell'antigene persistono a lungo termine dopo l'infezione/vaccinazione, e sono in grado di espandersi rapidamente dopo il richiamo e riconoscimento dell'antigene, riuscendo così a contrastare rapidamente l'infezione da PCV2<sup>83</sup>.

Nonostante il successo della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2<sup>28</sup>. Attualmente, i vaccini anti-PCV2 sono ampiamente utilizzati ma, poiché non inducono un'immunità protettiva nei confronti dell'infezione, il virus continua a circolare anche nelle aziende suinicole che applicano la vaccinazione<sup>84</sup>. È stato dimostrato che vi sono differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini commerciali registrati per l'uso sui suinetti: il vaccino allestito con virus chimerico PCV1/PCV2 determina la produzione di proporzioni relative più elevate di cellule CD4+ e livelli più elevati di risposta IFN- $\gamma$ -SC e NA rispetto ai due vaccini a subunità, e si ritiene che la differenza nelle risposte immunitarie possa essere dovuta a differenze nella composizione degli antigeni o al tipo di adiuvanti usati nella formulazione dei prodotti. Lo stesso antigene Cap in formulazione con diversi adiuvanti determina risposte simili nei suinetti vaccinati con i due vaccini a subunità, e questo suggerisce che il tipo antigenico, piuttosto che il tipo di adiuvante, può essere l'elemento critico nella risposta immunitaria<sup>60</sup>.

La proteina del capsido è il determinante antigenico principale del virus, verso cui sono dirette le risposte del sistema

immunitario; risulta essere quindi sottoposta ad elevata pressione selettiva, come osservato dal più alto tasso di mutazione nel gene che la codifica<sup>46,76</sup>. La risposta del sistema immunitario nei confronti di PCV2 è generata dall'equilibrio tra risposte umorali e cellulo-mediate<sup>73,74</sup> ed è stato dimostrato<sup>81</sup> come nello sviluppo di una risposta cellulo-mediata nei confronti di PCV2 siano coinvolte la proteina Cap e la proteina Rep codificate dai geni ORF1 e ORF2 del virus: da ciò l'importanza di comprendere la caratterizzazione delle regioni antigeniche e immunogeniche della proteina Cap-PCV2, che può contribuire al miglioramento delle formulazioni vaccinali<sup>85</sup>.

Gli epitopi immunodominanti della proteina del capsido di PCV2, costituita di 233 residui, inizialmente sono stati individuati come localizzati nei residui aminoacidici 65-87, 113-139, 168-183 e presso gli ultimi 4 aminoacidi dell'estremità carbossi-terminale della proteina<sup>86</sup>. Nel corso degli anni si sono susseguiti numerosi studi per la caratterizzazione delle regioni epitopiche del Cap-PCV2. Nello studio di Santos *et al.*<sup>85</sup>, l'evidenza di risposta immunitaria Th1 e Th2 nel modello topo in seguito a stimolazione con i nuovi siti antigenici rilevati, seguita dalla convalida mediante test ELISA su siero di suino, mostra come il sito antigenico rilevato possa essere importante durante l'infezione da PCV2, e potrebbe essere utile come obiettivo per la progettazione futura di nuovi antigeni ricombinanti, al fine di migliorare l'efficacia delle risposte vaccinali.

Per migliorare l'efficacia dei vaccini, altre ricerche si stanno concentrando sullo studio di coniugazione degli antigeni con adiuvanti diversi da quelli presenti nei vaccini commerciali; è il caso dello studio di una formulazione vaccinale mediante coniugazione covalente di vaccino inattivato-PCV2 con oligosaccaridi di chitosano (COS), che hanno mostrato versatili funzioni biologiche tra cui quella immunostimolante<sup>87</sup>.

Allo stesso modo, alcuni autori<sup>88</sup>, propongono l'utilizzo di citochine (IL-2 e IL-4/6), molecole regolatorie chiave delle funzioni immunitarie in termini di coordinazione delle risposte cellulari Th1 e Th2, come coadiuvanti nel determinare una risposta immunitaria proteggente e completa. I risultati dello studio confermano l'importante ruolo proteggente della risposta cellulo-mediata, dal momento che il vaccino sperimentale PCV2+IL4/6-2 non ha migliorato tanto la risposta immunitaria umorale quanto quella cellulare: i livelli di anticorpi specifici per PCV2 indotti dal vaccino PCV2+IL4/6-2 risultano simili a quelli ottenuti con vaccini tradizionali; al contrario, il miglioramento delle risposte immunitarie in seguito alla vaccinazione sperimentale è caratterizzato da un significativo aumento della risposta Th1, con incremento dell'espressione di cellule CD4+, CD8+, IL-2 e TNF- $\alpha$  e aumento dell'espressione di geni correlati, come quelli dei TLR, ad evidenziare un rafforzamento concomitante dell'immunità innata, oltre che di quella adattativa<sup>88</sup>.

## CONCLUSIONI

Con l'avvento della vaccinazione, sia l'incidenza sia la gravità delle *porcine circovirus diseases* (PCVD) si è fortemente ridotta. Tuttavia, i vaccini attualmente disponibili non sono in grado di prevenire le infezioni subcliniche che rappresentano attualmente il problema principale sia in termini di ridu-

zione della produttività degli animali sia in termini di interazione sinergica con altri patogeni aziendali.

Lo studio e la comprensione dell'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e dei meccanismi alla base dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva, sono i necessari presupposti per la sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali. L'obiettivo per il prossimo futuro sarà quello di rendere disponibili dei vaccini che siano in grado di ridurre non solo l'espressione clinica delle PCVD ma che possano garantire anche una significativa riduzione della prevalenza di infezioni subcliniche, aprendo così la strada alla concreta possibilità di eradicazione di PCV2 dalle aziende suinicole.

## ■ Interaction between PCV2 and immune system. What changed after the introduction of vaccination

### SUMMARY

Porcine circovirus diseases (PCVD) are important causes of economic losses in intensive pig farming. Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes systemic (post-weaning multisystemic wasting syndrome - PMWS) and localized (respiratory, enteric, dermatitis-nephritis and reproductive) diseases and is also responsible for subclinical forms of infection causing reduction of average daily gain, growth retardation and increased susceptibility to other infections. For these reasons, PCV2 infection control is an international priority. In recent years, the availability of safe and effective vaccines has made it possible to reduce the incidence and severity of clinical forms, in particular PMWS, to increase the productivity of growing animals and to improve the reproduction parameters of sows. However, despite the successes of vaccination, most of the pig population is still PCV2 chronically infected, even in farms that use indirect prophylaxis plans. In addition, available vaccines are not able to prevent subclinical infections that are currently the main health problem. In subclinical infections, function loss of the natural interferon-producing cells (NIPC) and downregulation of TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  take place. These changes allow an altered balance of pro-inflammatory, pro-immune and regulatory cytokines that result in the upregulation of IL-10 and down-regulation IFN- $\gamma$ . The effect is the inefficiency in triggering of an adequate innate pro-inflammatory response, impairment of the recognition of viral and bacterial associated signals, and consequently impairment of the T and B cell responses. Due to these interactions between PCV2 and the immune system, an impairment of both innate and adaptive responses allow the occurrence of subclinical infections that are responsible for severe economic consequences. This impairment of innate and adaptive defenses also explains the role played by PCV2 in coinfections. The anti-PCV2 vaccination can therefore, indirectly, improve the health status also against other pathogens reducing, for example, the incidence of the porcine respiratory diseases complex (PRDC). Furthermore, in farms where PCV2 and PRRSV are circulating simultaneously, vaccination against PCV2 increases the effectiveness of the anti-PRRSV vaccine. The understanding of the interaction between PCV2 and the immune system and the mechanisms underlying the development of a protective immune

response are the necessary prerequisites for the testing of new vaccine formulations. The goal for the near future will be to make available vaccines that can not only decrease the clinical expression of PCVD, but also guarantee a significant reduction in the prevalence of subclinical infections, thus paving the way for the concrete possibility of eradication of PCV2 from pig farms.

### KEY WORDS

Swine; PCV2; PCVD; immune system; vaccination.

### Bibliografia

1. Segales J, Kekarainen T, Cortey M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol*, 165: 13-20.
2. Patterson A.R, Opriessnig T. (2010). Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*, 11: 217-34.
3. Albina E., Truong C., Hutet E., Blanchard P., Cariolet R., L'Hospitalier R., Mahe D., Alee C., Morvan H., Amenna N., Le Dimna M., Madec F., Jestin A. (2001). An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol*, 125: 292-303.
4. 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 geographic origins. *Vaccine*, 26: 1063-71.
5. Cline G., Wilt V., Diaz E., Edler R. (2008). Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet Rec*, 163: 737-40.
6. Fachinger V., Bischoff R., Jedidia S.B., Saalmuller A., Elbers K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, 26: 1488-99.
7. 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: 7313-21.
8. Kurmann J., Sydler T., Brugnera E., Buergi E., Haessig M., Suter M., Sidler X. (2011). Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol*, 18: 1644-9.
9. Gerber P.F., Garrocho F.M., Lana A.M., Lobato Z.I. (2011). Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J*, 188: 240-2.
10. Meng X.J. (2013). Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*, 1: 43-64.
11. Chianini F., Majo N., Segales J., Dominguez J., Domingo M. (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 94: 63-75.
12. Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcato P.S. (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 83: 53-67.
13. Marruchella G., Valbonetti L., Bernabo N., Ligios C. (2017). Depletion of follicular dendritic cells in tonsils collected from PMWS-affected pigs. *Arch Virol*, 162: 1281-1287.
14. Darwich L., Segales J., Domingo M., Mateu E. (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 236-42.
15. Mandrioli L., Sarli G., Panarese S., Baldoni S., Marcato P.S. (2004). Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 97: 25-37.
16. Gilpin D.F., McCullough K., Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Stevenson L.S., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka S., Adair B.M., Allan G.M.

- (2003). In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol*, 94: 149-61.
17. Steiner E., Balmelli C., Herrmann B., Summerfield A., McCullough K. (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 378: 311-22.
  18. Vincent I.E., Balmelli C., Meehan B., Allan G., Summerfield A., McCullough K.C. (2007). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*, 120: 47-56.
  19. Vincent I.E., Carrasco C.P., Guzylack-Piriou L., Herrmann B., McNeily F., Allan G.M., Summerfield A., McCullough K.C. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*, 115: 388-98.
  20. Balmelli C., Steiner E., Moulin H., Peduto N., Herrmann B., Summerfield A., McCullough K. (2011). Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 132: 57-65.
  21. Darwich L., Mateu E. (2012). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 61-7.
  22. Grau-Roma L., Hjulsager 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 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: 272-82.
  23. Okuda Y., Ono M., Yazawa S., Shibata I. (2003). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest*, 15: 107-14.
  24. McIntosh K.A., Harding J.C., Ellis J.A., Appleyard G.D. (2006). Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Can J Vet Res*, 70: 58-61.
  25. Segales J. (2015). Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev Vaccines*, 14: 473-87.
  26. 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 Microbiol*, 125: 244-55.
  27. Meerts P., Misinzo G., Lefebvre D., Nielsen J., Botner A., Kristensen C.S., Nauwynck H.J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res*, 2: 6.
  28. Afghah Z., Webb B., Meng X.J., Ramamoorthy S. (2017). Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility? *Vet Microbiol*, 206: 21-28.
  29. Borghetti P., Morganti M., Saleri R., Ferrari L., De Angelis E., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Martelli P. (2013). Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet Microbiol*, 163: 42-53.
  30. Kekarainen T., Montoya M., Mateu E., Segales J. (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol*, 89: 760-5.
  31. Darwich L., Segales J., Resendes A., Balasch M., Plana-Duran J., Mateu E. (2008). Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res Vet Sci*, 84: 194-8.
  32. Yue F., Cheng A., Zhu Y., Li P., Zhang Y., Sun G., Wang M., Wang X. (2015). Overexpression of programmed death ligands in naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Viral Immunol*, 28: 101-6.
  33. Richmond O., Cecere T.E., Erdogan E., Meng X.J., Pineyro P., Subramaniam S., Todd S.M., LeRoith T. (2015). PD-L1 expression is increased in monocyte derived dendritic cells in response to porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Vet Immunol Immunopathol*, 168: 24-9.
  34. 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: 4031-7.
  35. Meerts P., Van Gucht S., Cox E., Vandebosch A., Nauwynck H.J. (2005). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol*, 18: 333-41.
  36. Opriessnig T., Halbur P.G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res*, 164: 20-32.
  37. 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). *Vet Pathol*, 38: 31-42.
  38. Hoogland M.J., Opriessnig T., Halbur P.G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Journal of Swine Health and Production*, 14: 7.
  39. Sibila M., Calsamiglia M., Segales J., Blanchard P., Badiella L., Le Dimna M., Jestin A., Domingo M. (2004). Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res*, 65: 88-92.
  40. Rose N., Opriessnig T., Grasland B., Jestin A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 78-89.
  41. Sinha A., Shen H.G., Schalk S., Beach N.M., Huang Y.W., Meng X.J., Halbur P.G., Opriessnig T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet Microbiol*, 152: 235-46.
  42. Martin H., Le Potier M.F., Maris P. (2008). Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet J*, 177: 388-93.
  43. Andraud M., Rose N., Grasland B., Pierre J.S., Jestin A., Madec F. (2009). Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: a modelling approach. *Prev Vet Med*, 92: 38-51.
  44. Maes D., Van Soom A., Appeltant R., Arsenakis I., Nauwynck H. (2016). Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology*, 85: 27-38.
  45. Chae C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J*, 194: 151-7.
  46. Karuppanan A.K., Opriessnig T. (2017). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*, 9.
  47. Ellis J. (2014). Porcine circovirus: a historical perspective. *Vet Pathol*, 51: 315-27.
  48. Alarcon P., Rushton J., Nathues H., Wieland B. (2013). Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Prev Vet Med*, 110: 103-18.
  49. Beach N.M., Meng X.J. (2012). Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 33-42.
  50. Fraile L., Grau-Roma L., Sarasola P., Sinovas N., Nofrarias M., Lopez-Jimenez R., Lopez-Soria S., Sibila M., Segales J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*, 30: 1986-92.
  51. Dvorak C.M., Yang Y., Haley C., Sharma N., Murtaugh M.P. (2016). National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Vet Microbiol*, 189: 86-90.
  52. Ostanello F., Caprioli A., Di Francesco A., Battilani M., Sala G., Sarli G., Mandrioli L., McNeilly F., Allan G.M., Prosperi S. (2005). Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol*, 108: 179-86.
  53. Dvorak C.M.T., Payne B.J., Seate J.L., Murtaugh M.P. (2018). Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics and Control of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Offspring. *Viral Immunol*, 31: 40-46.
  54. Pejsak Z., Podgorska K., Trusczyński M., Karbowski P., Stajek T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33: e1-5.
  55. Pejsak Z., Kusior G., Pomorska-Mol M., Podgorska K. (2012). Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. *Pol J Vet Sci*, 15: 37-42.
  56. Oropeza-Moe M., Oropeza Delgado A.J., Framstad T. (2017). Porcine circovirus type 2 associated reproductive failure in a specific pathogen free (SPF) piglet producing herd in Norway: a case report. *Porcine Health Manag*, 3: 25.
  57. 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 Microbiol*, 142: 177-83.

58. Feng H., Segales J., Fraile L., Lopez-Soria S., Sibila M. (2016). Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. *Vaccine*, 34: 3044-3050.
59. Oh Y., Seo H.W., Park C., Chae C. (2014). Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge. *Vet Microbiol*, 172: 371-80.
60. Seo H.W., Lee J., Han K., Park C., Chae C. (2014). Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines. *Res Vet Sci*, 97: 38-42.
61. Chae C. (2016). Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J*, 212: 1-6.
62. Opriessnig T., Madson D.M., Prickett J.R., Kuhar D., Lunney J.K., Elsener J., Halbur P.G. (2008). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet Microbiol*, 131: 103-14.
63. Park C., Seo H.W., Park S.J., Han K., Chae C. (2014). Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 95: 2486-94.
64. Park C., Oh Y., Seo H.W., Han K., Chae C. (2013). Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clin Vaccine Immunol*, 20: 369-76.
65. Martelli P., Ardigo P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Luppi A., Guazzetti S., Caleffi A., Borghetti P. (2013). Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Vet Microbiol*, 162: 558-71.
66. Seo H.W., Park S.J., Park C., Chae C. (2014). Interaction of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines on dually infected pigs. *Vaccine*, 32: 2480-6.
67. Xiao C.T., Harmon K.M., Halbur P.G., Opriessnig T. (2016). PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016. *Vet Microbiol*, 197: 72-77.
68. Lv Q.Z., Guo K.K., Zhang Y.M. (2014). Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*, 49: 1-10.
69. Opriessnig T., O'Neill K., Gerber P.F., de Castro A.M., Gimenez-Liro-la L.G., Beach N.M., Zhou L., Meng X.J., Wang C., Halbur P.G. (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 31: 487-94.
70. 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. *Infect Genet Evol*, 32: 409-15.
71. Kekalainen 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: 1734-42.
72. Huang L.P., Lu Y.H., Wei Y.W., Guo L.J., Liu C.M. (2011). Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol*, 11: 188.
73. Kekalainen 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: 185-93.
74. Fort M., Sibila M., Nofrarias M., Perez-Martin E., Olvera A., Mateu E., Segales J. (2012). Evaluation of cell-mediated immune responses against porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins after vaccination with a commercial PCV2 sub-unit vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 150: 128-32.
75. Jeong J., Park C., Choi K., Chae C. (2015). Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. *Vet Microbiol*, 177: 43-52.
76. Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol*, 96: 1830-41.
77. Matzinger S.R., Opriessnig T., Xiao C.T., Catanzaro N., Beach N.M., Slade D.E., Nitzel G.P., Meng X.J. (2016). A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*, 498: 82-93.
78. Feng H., Blanco G., Segales J., Sibila M. (2014). Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol*, 172: 92-9.
79. Velasova M., Alarcon P., Werling D., Nevel A., Wieland B. (2013). Effectiveness of porcine circovirus type 2 vaccination in reducing the severity of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet J*, 197: 842-7.
80. Steiner E., Balmelli C., Gerber H., Summerfield A., McCullough K. (2009). Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res*, 5: 45.
81. Fort M., Sibila M., Nofrarias M., Perez-Martin E., Olvera A., Mateu E., Segales J. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 137: 226-34.
82. Koinig H.C., Talker S.C., Stadler M., Ladinig A., Graage R., Ritzmann M., Hennig-Pauka I., Gerner W., Saalmuller A. (2015). PCV2 vaccination induces IFN-gamma/TNF-alpha co-producing T cells with a potential role in protection. *Vet Res*, 46: 20.
83. Ferrari L., Borghetti P., De Angelis E., Martelli P. (2014). Memory T cell proliferative responses and IFN-gamma productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Vet Res*, 45: 44.
84. Kekalainen T., Segales J. (2015). Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine Health Manag*, 1: 17.
85. Santos M.R., Assao V.S., Santos F.A.A., Salgado R.L., Carneiro A.P., Fietto J.L.R., Bressan G.C., de Almeida M.R., Lobato Z.I.P., Ueira-Vieira C., Goulart L.R., Silva-Junior A. (2018). Utilization of phage display to identify antigenic regions in the PCV2 capsid protein for the evaluation of serological responses in mice and pigs. *Arch Virol*, 163: 1877-1887.
86. Lekcharoensuk P., Morozov I., Paul P.S., Thangthumniyom N., Wajjawalku W., Meng X.J. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol*, 78: 8135-45.
87. Zhang G., Cheng G., Jia P., Jiao S., Feng C., Hu T., Liu H., Du Y. (2017). The Positive Correlation of the Enhanced Immune Response to PCV2 Subunit Vaccine by Conjugation of Chitosan Oligosaccharide with the Deacetylation Degree. *Mar Drugs*, 15.
88. Chen Y., Song T., Xiao Y.L., Wan X., Yang L., Li J., Zeng G., Fang P., Wang Z.Z., Gao R. (2018). Enhancement of immune response of piglets to PCV-2 vaccine by porcine IL-2 and fusion IL-4/6 gene entrapped in chitosan nanoparticles. *Res Vet Sci*, 117: 224-232.