

VALUTAZIONE SIEROLOGICA DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO ANTI-PCV2

SEROLOGICAL EVALUATION OF A VACCINE AGAINST PCV2

OSTANELLO F.¹, GRANITO G.², RUGNA G.³, LELLI D.³, LEOTTI G.⁴,
MERIALDI G.³, BIANCHI M.⁴

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna; ²Veterinario libero professionista; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna; ⁴Merial Italia

Parole chiave: Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2), vaccinazione, sierologia, suinetti
Key words: Porcine Circovirus type 2 (PCV2), vaccination, serology, piglets

Riassunto. La prova è stata condotta per valutare l'efficacia sierologica di un vaccino anti PCV2 in un allevamento con anamnesi positiva per PMWS. In due gruppi di scrofe (vaccinate e non vaccinate), sono stati valutati i titoli anticorpali pre-vaccinazione (6 settimane dal parto) e quelli presenti 10 giorni dopo il parto. Analogamente, su un campione di suinetti nati sia da scrofe vaccinate sia da scrofe non vaccinate, è stato determinato il titolo anticorpale anti PCV2 a 10 e a 20 giorni di vita. Per la valutazione sierologica sono state utilizzate due diverse metodiche immunoenzimatiche. Nelle scrofe vaccinate, il titolo anticorpale a 10 giorni dopo il parto è risultato significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo. Anche i titoli anticorpali nei suinetti nati da madri vaccinate hanno messo in evidenza un'analogia differenza sia a 10 che a 20 giorni di vita.

Summary. The trial was performed to evaluate the serological efficacy of a vaccine against PCV2 in a herd with a history of PMWS. In two groups of sows (vaccinated and unvaccinated) antibody titers pre-vaccination (6 weeks before delivery) were compared with those at 10 days postpartum. Similarly, the antibody titers were determined at 10 and 20 days of age in a sample of piglets born from both vaccinated and unvaccinated sows. For the serological evaluation two different ELISA methods were using. In vaccinated sows, the antibody titer 10 days after delivery was significantly higher than that of the control group. Also the antibody level in piglets born from vaccinated sows showed a similar difference at 10 and 20 days of life.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus a DNA a singolo filamento circolare, appartenente alla famiglia *Circoviridae*. PCV2 è ritenuto il principale responsabile di numerose patologie, attualmente definite come porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) in nord America o porcine circovirus diseases (PCVD) in Europa (Gillespie e coll., 2009; Grau-Roma e coll., 2011). Oltre alla *Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS), ora denominata, in nord America, *PCV2-associated systemic infection* (Opriessnig e coll., 2007), anche la *Dermatitis and Nephropathy Syndrome* (PDNS), alcune sindromi respiratorie, patologie enteriche, disordini riproduttivi su base individuale o di allevamento, sono comprese nella definizione PCVD/PCVAD. La prevalenza delle PCVD ha subito un progressivo aumento nell'ultimo decennio, in particolare negli allevamenti di grandi dimensioni, rappresentando oggi una delle patologie con il più elevato impatto economico nell'industria suinicola mondiale (Gillespie e coll., 2009).

Ancora oggi, la parte più significativa delle manifestazioni patologiche associate all'infezione da PCV2 è rappresentata dalla PMWS (Gillespie e coll., 2009). La PMWS interessa principalmente i suinetti tra le 7 e le 12 settimane di vita, causando mediamente una mortalità pari al 10% e una riduzione sensibile degli indici di accrescimento. PCV2 è un virus ubiquitario nella popolazione suina ed è presente sia in allevamenti colpiti da PMWS sia in allevamenti non affetti dalla sindrome. La presenza di PCV2 è quindi necessaria ma non sufficiente per determinare la malattia che può essere considerata una patologia condizionata (Kekarainen e coll., 2010). I fattori condizionanti fino ad oggi individuati sono numerosi e possono essere di natura ambientale, microbiologica, genetica, manageriale, immunitaria. Questi fattori agiscono secondo combinazioni diverse in funzione della specifica azienda e rendono estremamente difficile la riproduzione sperimentale della malattia. Occorre inoltre sottolineare due ulteriori aspetti delle patologie associate a PCV2. Il primo è quello relativo al fatto che è stato dimostrato che l'infezione da PCV2, anche in assenza di sintomatologia clinica, agisce negativamente sulle performances produttive dei suini in fase di accrescimento (Ostanello e coll., 2005; Lyoo e coll., 2010); il secondo punto riguarda il ruolo che ha l'immunità nel ridurre l'espressione patogena di PCV2 e la quantità di virus eliminato nell'ambiente dai soggetti infetti (Opriessnig e coll., 2009; Opriessnig e coll., 2010; Grau-Roma e coll., 2011). L'osservazione che in condizioni sperimentali è possibile infettare suinetti che presentano elevati titoli anticorpali (Ostanello e coll., 2005; Ford e coll., 2009) ma che in questi animali l'incremento ponderale è migliore rispetto a soggetti con titoli anticorpali inferiori (Ostanello e coll., 2005; Opriessnig e coll., 2010), dimostra che l'immunità (attiva o passiva) gioca un ruolo importante in termini di prevenzione del danno zootecnico e apre interessanti prospettive nell'utilizzo di vaccini anti-PCV2 non solo nelle aziende con problemi clinici da PMWS, ma anche negli allevamenti con anamnesi negativa per PMWS.

Il presente lavoro ha avuto come scopi principali: a) valutare, in condizioni di campo, la risposta anticorpale anti-PCV2 in scrofe vaccinate rispetto ad un gruppo di controllo costituito da scrofe non vaccinate; b) valutare eventuali differenze dei titoli anticorpali anti PCV2 in suinetti nati da scrofe vaccinate rispetto ad un gruppo di suinetti di controllo nati da madri non vaccinate. E' stato inoltre condotto un confronto tra i risultati ottenuti utilizzando due diverse metodiche immunoenzimatiche: 1) test ELISA messo a punto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), routinariamente utilizzato in Italia per la diagnosi sierologica dell'infezione da PCV2 e, b) test ELISA commerciale (SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France), frequentemente utilizzato in altri Paesi europei. Tale confronto è stato eseguito anche con lo scopo di fornire al medico veterinario alcune indicazioni utili alla comparazione dei risultati ottenuti impiegando il primo dei due test, con alcune delle informazioni presenti in letteratura.

MATERIALI E METODI

Azienda

La prova sperimentale è stata condotta nel periodo agosto-ottobre 2010. L'allevamento, a ciclo aperto e con rimonta interna, era costituito da circa 1500 scrofe produttive (Large White e Large White x Landrace). I soggetti svezzati destinati all'ingrasso vengono trasferiti in strutture separate rispetto al nucleo riproduttivo aziendale. L'anamnesi di allevamento riporta una condizione di stabilità dell'infezione da PRRSV e la circolazione di virus influenzali (SIV), *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Le scrofe erano vaccinate nei confronti del Parvovirus suino (PPV), virus della Malattia di Aujeszky, mal rosso, SIV e PRRSV.

Nell'azienda era stata effettuata la diagnosi della presenza di PMWS mediante esame istopatologico ed immunoistochimico e quantificazione della presenza di PCV2 nelle lesioni (Sarli e coll., 2009). Prima dell'inizio della prova, non era mai stato impiegato, per le scrofe, un vaccino anti PCV2.

Animali in sperimentazione

La prova è stata condotta su 23 animali fecondati nella medesima settimana e selezionati in modo da essere rappresentativi, per numero di parto e caratteristiche genetiche, delle scrofe presenti in azienda. Le scrofe sono state identificate singolarmente mediante registrazione del numero aziendale riportato sulla marca auricolare e divise in modo casuale in due gruppi (gruppo A: 11 scrofe; gruppo B: 12 scrofe). I soggetti del gruppo A sono stati vaccinati, secondo le indicazioni del produttore, inoculando una prima dose da 2 ml per via intramuscolare profonda nella regione retroauricolare, 6 settimane prima del parto e una seconda dose 3 settimane dopo. Il prodotto utilizzato è un vaccino inattivato contenente Circovirus suino tipo 2 (CIRCOVAC[®], Merial, Lyon, France), adiuvato con paraffina liquida leggera. I soggetti del gruppo B sono stati mantenuti come controlli non vaccinati. Al momento della prima somministrazione del vaccino (giorno 0) e 10 giorni dopo il parto, è stato prelevato un campione di sangue da tutti i soggetti in sperimentazione.

Per ogni nidata è stato selezionato in maniera casuale un campione costituito mediamente da 3 soggetti (gruppo C, suinetti nati da scrofe vaccinate: 30 animali; gruppo D, suinetti nati da scrofe non vaccinate: 34 soggetti). Da questi animali è stato effettuato un prelievo ematico a 10 e a 20 giorni di vita. Tutti gli animali in sperimentazione (scrofe e relativi suinetti) sono stati stabulati negli stessi locali.

Valutazione sierologica

La quantificazione degli anticorpi anti PCV2 è stata effettuata con due metodiche immunoenzimatiche. I sieri sono stati esaminati con una metodica ELISA di tipo competitivo messa a punto dall'IZSLER (Sala e coll., 2000) e con un kit commerciale, sempre di tipo competitivo (SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon).

Analisi statistica

Preliminarmente, è stata valutata la normalità della distribuzione campionaria dei dati quantitativi utilizzando il test di Kolmogoro-Smirnoff. Sulla base dei risultati di questo test, sono state realizzate le seguenti analisi, utilizzando sia i risultati forniti dal test ELISA-IZSLER sia quelli forniti dal test ELISA-Symbiotics: a) confronto, mediante test *t* di Student, della media dei titoli anticorpali anti PCV2 pre-vaccinali (t_0) e a 10 giorni dal parto (t_1) nelle scrofe dei due gruppi); b) confronto, mediante test *t* di Student per dati appaiati, della variazione dei titoli anticorpali anti PCV2 tra t_0 e t_1 nelle scrofe dei 2 gruppi.

Per quanto riguarda i suinetti, sono state realizzate le seguenti analisi utilizzando sia i risultati forniti dal test ELISA-IZSLER sia quelli forniti dal test ELISA-Symbiotics: c) confronto, mediante test *t* di Student, della media dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 giorni di vita (t_{10}) e a 20 giorni di vita (t_{20}) nei suinetti nati dalle scrofe dei due gruppi; d) confronto, mediante test *t* di Student per dati appaiati, della variazione dei titoli anticorpali anti PCV2 tra t_{10} e t_{20} nei soggetti nati da madri vaccinate e non vaccinate.

E' stato inoltre valutato il grado di correlazione tra i risultati forniti dai due test calcolando il coefficiente parametrico di correlazione (*r* di Pearson) o l'equivalente non parametrico (*rho* di Spearman).

Tutte le analisi sono state condotte utilizzando SPSS 12.0, previa trasformazione logaritmica (\log_{10}) dei risultati sierologici.

RISULTATI

Scrofe

Prima della somministrazione del vaccino (t_0), tutte le scrofe erano sieropositive per PCV2 e la media dei titoli anticorpali rilevati sia con la metodica ELISA-IZSLER sia con il kit commerciale (tab. 1) non era significativamente diversa nei due gruppi di scrofe in sperimentazione (rispettivamente: $t=-1,12$ $p=0,275$ e $t=-0,47$ $p=0,64$).

Tabella 1. Media del \log_{10} dei titoli anticorpali anti PCV2 pre- e post- vaccinazione valutati con 2 diverse metodiche ELISA nelle scrofe in sperimentazione

Table 1. Mean antibody titres (\log_{10}) against PCV2 pre-and post-vaccination, evaluated with two different ELISA methods in sows

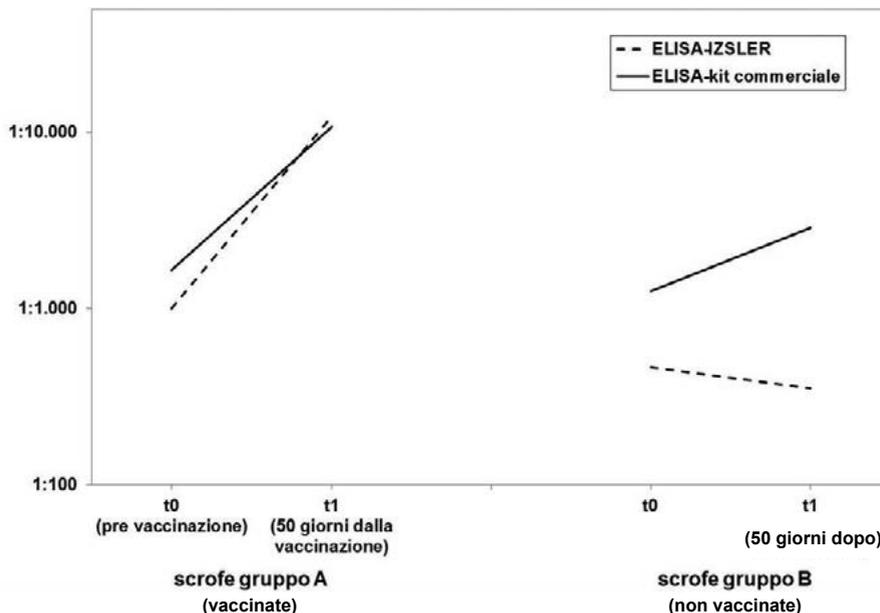
Metodica ELISA	Prelievo	Media (\log_{10}) \pm dev.std. del titolo anticorpale anti PCV2	
		gruppo A	gruppo B
ELISA-IZSLER	t0	3,00 \pm 0,77	2,67 \pm 0,65
	t1	4,09 \pm 0,70	2,55 \pm 0,52
ELISA- Synbiotics	t0	3,22 \pm 0,57	3,10 \pm 0,64
	t1	4,03 \pm 0,28	3,46 \pm 0,17

A 10 giorni dal parto (t1), cioè circa 50 giorni dopo la somministrazione della prima dose vaccinale, la media dei titoli anticorpali anti PCV2 rilevata utilizzando sia la metodica ELISA-IZSLER sia il kit commerciale è significativamente più elevata nel gruppo delle scrofe vaccinate (gruppo A) rispetto a quella del gruppo di controllo (gruppo B), (rispettivamente: (t test=-5,866; p <0,000 e (t test=-5,878; p <0,000).

Relativamente alla variazione dei titoli anticorpali tra i due prelievi (fig. 1), nel gruppo A è stato evidenziato un aumento statisticamente significativo dei valori, sia utilizzando la metodica ELISA-IZSLER (paired samples t test=-3,833; p =0,003), sia il kit commerciale (paired samples t test=-4,868; p =0,001).

Figura 1. Andamento dei titoli anticorpali anti PCV2 pre- e post- vaccinazione valutati con 2 diverse metodiche ELISA nelle scrofe in sperimentazione

Figure 1. Changes in antibody titers against PCV2 pre-and post-vaccination (10 days after delivery) evaluated with two different ELISA methods in sows



Nel gruppo B, non è stata messa in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa tra i due prelievi quando vengono utilizzati i valori forniti dalla metodica ELISA-IZSLER (paired samples *t* test=0,43; *p*=0,676), mentre viene evidenziato un aumento dei titoli anticorpali, ai limiti della significatività statistica, quando vengono utilizzati i valori ottenuti dal kit commerciale (paired samples *t* test=-2,335; *p*=0,040).

Suinetti

A 10 giorni di vita la media dei titoli anticorpali anti-PCV2 nei gruppi di suinetti nati da madri vaccinate è significativamente più elevata rispetto a quella degli animali nati dalle scrofe di controllo (metodica ELISA-IZSLER: *U* di Mann-Whitney=124; *p*<0,000 e kit commerciale: *U* di Mann-Whitney=8; *p*<0,000).

Anche a 20 giorni di vita, la media dei titoli anticorpali anti-PCV2 nei suinetti nati da madri vaccinate è significativamente più elevata rispetto a quella degli animali nati dalle scrofe di controllo (metodica ELISA-IZSLER: *U* di Mann-Whitney=116; *p*<0,000 e kit commerciale: *U* di Mann-Whitney=2; *p*<0,000). Inoltre, i titoli anticorpali sono più omogenei (tab. 2).

Tabella 2. Media del \log_{10} dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 e 20 giorni di vita dei suinetti nati da madri vaccinate e non vaccinate, valutati con 2 diverse metodiche ELISA

Table 2. Mean antibody titers (\log_{10}) against PCV2 in 10 and 20 days old piglets born from vaccinated and unvaccinated sows, assessed with two different ELISA methods

Metodica ELISA	giorni di vita	Media (\log_{10}) \pm dev.std. del titolo anticorpale anti PCV2	
		nati da madri vaccinate	nati da madri non vaccinate
ELISA-IZSLER	10	4,40 \pm 0,62	3,03 \pm 0,87
	20	3,50 \pm 0,63	2,35 \pm 0,85
ELISA- Synbiotics	10	4,11 \pm 0,09	3,44 \pm 0,40
	20	3,98 \pm 0,16	3,32 \pm 0,40

Tra i 10 e i 20 giorni di vita (fig. 2), si osserva, complessivamente, una diminuzione dei titoli anticorpali nei soggetti dei 2 gruppi. In particolare, nei soggetti nati da madri vaccinate tale decremento risulta statisticamente significativo sia utilizzando i risultati del test ELISA-IZSLER (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-4,508; *p*<0,000), sia utilizzando i risultati del kit commerciale (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-3,543; *p*<0,000).

Nei suinetti nati da scrofe non vaccinate, la riduzione dei titoli anticorpali risulta statisticamente significativa quando vengono valutati i risultati del test ELISA-IZSLER (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-3,491; *p*<0,000), ma non quando vengono utilizzati i risultati del kit commerciale (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-1,283; *p*=0,200).

Correlazione tra i risultati dei 2 test ELISA

Tutti i sieri esaminati sono risultati positivi ad entrambe le metodiche. I risultati quantitativi mostrano valori di correlazione altamente significativi sia nella valutazione effettuata sul siero delle scrofe prima della somministrazione del vaccino (fig. 3a), sia in quella effettuata a 10 giorni dal parto (fig. 3b), (rispettivamente: *r*=0,831; *p*<0,01 e *r*=0,770; *p*<0,01).

Figura 2. Andamento dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 e 20 giorni di vita nei suinetti nati da madri vaccinate e non vaccinate, valutati con 2 diverse metodiche ELISA

Figure 2. Changes in antibody titers against PCV2 in 10 and 20 days old piglets born from vaccinated and unvaccinated sows, assessed with two different ELISA methods

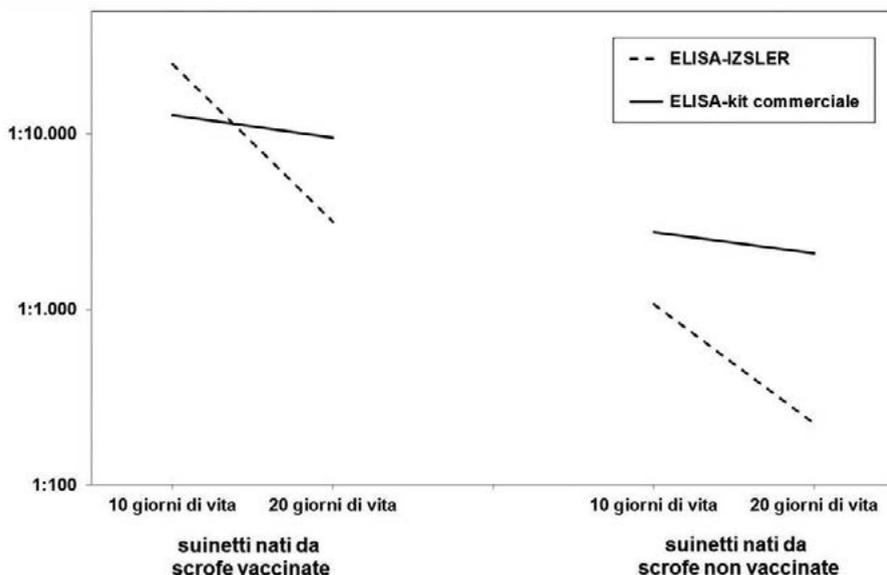
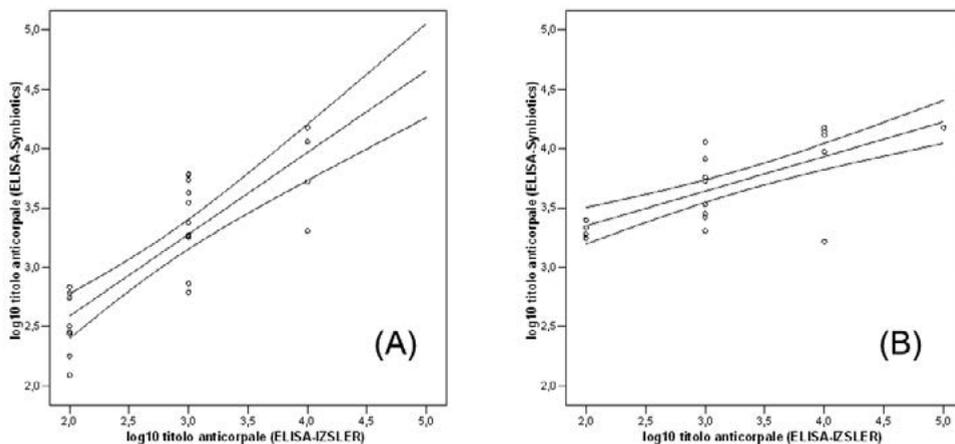


Figura 3. Regressione dei titoli anticorpali anti-PCV2 (\log_{10}) misurati prima della vaccinazione (A) e 10 giorni dopo il parto (B) nei due gruppi di scrofe. I punti nel grafico evidenziano le corrispondenze tra i titoli sierologici ottenuti con il test ELISA-IZSLER e quelli forniti dal kit commerciale.

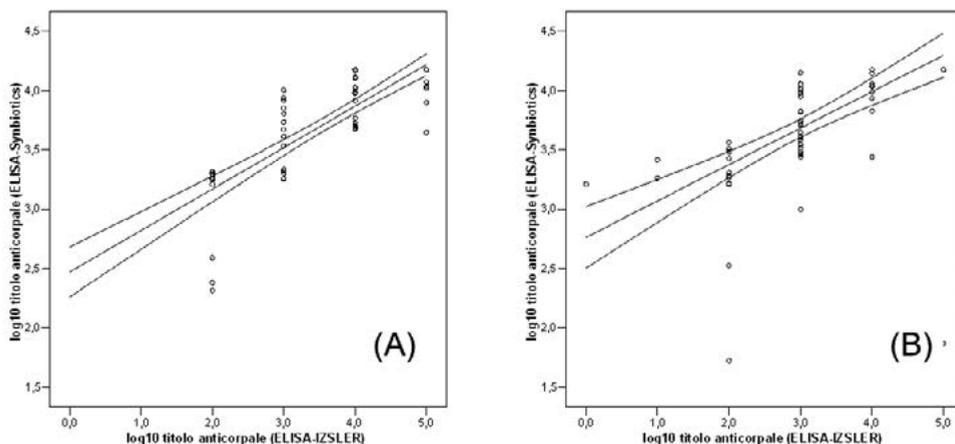
Figure 3. Linear regression of anti-PCV2 antibody titers (\log_{10}) measured before vaccination (A) and 10 days after the delivery (B) in both groups of sows. The points on the graph show the correspondences between the titles obtained by the ELISA-IZSLER method and those obtained with the ELISA commercial method.



Analogamente, anche l'esame dei sieri dei suinetti a 10 (fig. 4a) e a 20 giorni di vita (fig. 4b) mostra valori di correlazione altamente significativi tra i risultati ottenuti con i due test ELISA (rispettivamente: ρ di Spearman=0,817; $p<0,01$ e ρ di Spearman =0,780; $p<0,01$).

Figura 4. Regressione dei titoli anticorpali anti-PCV2 (\log_{10}) misurati a 10 giorni di vita (A) e 20 giorni di vita (B) nei due gruppi di suinetti. I punti nel grafico evidenziano le corrispondenze tra i titoli sierologici ottenuti con il test ELISA-IZSLER e quelli forniti dal kit commerciale.

Figure 4. Linear regression of anti-PCV2 antibody titers (\log_{10}) measured at 10 (A) and 20 (B) days of life in both groups of piglets. The points on the graph show the correspondences between the titles obtained by the ELISA-IZSLER method and those obtained with the ELISA commercial method.



DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione confermano l'efficacia della vaccinazione anti PCV2 in termini di stimolazione dell'immunità attiva anche in scrofe con elevati titoli anticorpali. Il valore medio dei titoli anticorpali delle scrofe vaccinate (gruppo A), misurato 10 giorni dopo il parto, è significativamente più elevato rispetto a quello di scrofe di controllo non vaccinate. Tale differenza è particolarmente significativa se si considera che i due interventi vaccinali effettuati sulle scrofe del gruppo A rappresentano esclusivamente l'immunizzazione di base. Verosimilmente, i richiami vaccinali, eseguiti nel corso delle gravidanze successive, potrebbero contribuire ad far aumentare ulteriormente i titoli anticorpali anti PCV2.

L'efficacia immunitaria della vaccinazione è confermata inoltre dalle valutazioni eseguite sui suinetti. Gli animali nati da madri vaccinate presentano valori medi di titoli anticorpali specifici per PCV2 significativamente più elevati rispetto a suinetti nati da scrofe non vaccinate, sia a 10 sia a 20 giorni di vita. Questa osservazione conferma quanto riportato da altri Autori che hanno dimostrato una correlazione positiva tra i titoli anticorpali materni e immunità passiva dei suinetti (Baysinger e coll., 2010). Evidenze sperimentali (McKeown et al., 2005) hanno dimostrato che elevati titoli anticorpali passivi riducono le probabilità di infezione nei soggetti esposti e la quantità di virus che è possibile mettere in evidenza nel siero, al contrario di quanto accade in soggetti con bassi titoli anticorpali. Inoltre, quantità superiori di anticorpi specifici anti PCV2 di origine materna, garantiscono una maggiore durata dell'immunità (Sidler e coll., 2010). E' stato anche dimostrato (Opriessnig e coll., 2010) come l'immunizzazione passiva o attiva dei suinetti abbia una efficacia paragonabile in

termini di riduzione dell'escrezione di PCV2 e della quantità di virus presente nei suinetti. Nelle scrofe non vaccinate, il titolo anticorpale anti PCV2, determinato utilizzando il test ELISA-IZSLER, pur riducendosi leggermente, non differisce in maniera significativa nei due momenti (t0: 2,67; t1: 2,55). Al contrario, i risultati del test ELISA-Symbiotics mettono in evidenza un incremento, ai limiti della significatività statistica, dei titoli anticorpali tra t0 e t1 (rispettivamente: 3,10 e 3,46)

In entrambi i gruppi di suinetti, i titoli anticorpali tendono a ridursi nel tempo e, nei soggetti nati da scrofe vaccinate, tale decremento risulta statisticamente significativo utilizzando i risultati forniti da entrambi i test ELISA. Nei suinetti nati da madri non vaccinate, la riduzione dei titoli anticorpali nel tempo risulta statisticamente significativa quando vengono valutati i risultati del test ELISA-IZSLER, ma non quando vengono utilizzati i risultati del kit commerciale.

Considerando che le due metodiche ELISA sono tra loro molto simili, sia in termini di schema di reazione sia per quanto riguarda l'antigene utilizzato e che la valutazione complessiva dei risultati forniti nelle diverse categorie di soggetti e nei diversi momenti considerati dimostra una forte correlazione, risulta difficile avanzare delle ipotesi che giustifichino le discordanze evidenziate.

Bibliografia

1. Baysinger A., Diaz E., Edler R. (2010). Profile and agreement of dam and piglet PCV2 IFA titers. Proc. 21st IPVS Congress, 307.
2. Fort M., Sibila M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Mateu E., Segalés 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.
3. Gillespie J., Opriessnig T., Meng X.J., Pelzer K., Buechner-Maxwell V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 23, 1151-1163.
4. Grau-Roma L., Fraile L., Segalés J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.*, 187, 23-32.
5. Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J., Allan G.M. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136, 185-193.
6. Lyoo K, Joo H, Caldwell B, Kim H, Davies PR, Torrison J. (2010). Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *Vet J.*, in press.
7. McKeown N.E., Opriessnig T., Thomas P., Guenette D.K., Elvinger F., Fenaux M., Halbur P.G., Meng X.J. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 1347-1351.
8. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591-615.
9. Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Halbur P.G. (2009). Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. *Vaccine* 27, 1002-1007.
10. 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, 177-183.

11. 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, 179-186.
12. Sala G., Rigola S., Alborali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000). Development of monoclonal antibodies based ELISAS for the detection of antibodies against porcine Circovirus type 1 and type 2. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy.
13. 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 postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Vet. Rec.* 164, 519-523.
14. Sidler X., Kurmann J., Buergi E., Brugnera E., Sydler T. (2010). Induction of maternal antibodies and the effect on growth parameters by Circovac® in a field study. Proceedings of the 21st IPVS Congress, 418.