

Identificazione e caratterizzazione molecolare di *Atypical Porcine Pestivirus (APPV)* nel centro Italia



CARMEN ISCARO, SILVIA PIRANI, FRANCESCO FELIZIANI, SILVA COSTARELLI, JACOPO ZEMA, MARCO SENSI, MONICA GIAMMARIOLI, GIAN MARIO DE MIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "Togo Rosati", Perugia, Italy

RIASSUNTO

Scoperto per la prima volta in USA nel 2015, APPV (Atypical Porcine Pestivirus) o Pestivirus K è stato successivamente riscontrato anche in Europa e in Asia, sia nei suini domestici che nei cinghiali, talvolta in associazione a forme di tremore congenito (CT) dei suinetti. Questo studio riporta i risultati di una analisi virologica retrospettiva condotta allo scopo di accertare la presenza del virus nel centro Italia. Su un totale di 1665 sieri prelevati nel triennio 2016-2018 e provenienti da Umbria, Marche, Abruzzo e Lazio, un solo campione è risultato positivo. Esso, denominato APPV-LA/4911/2016, deriva da un siero di un suino adulto e asintomatico proveniente da una azienda da riproduzione del Lazio, che non riporta alcuna notizia anamnestica di CT. L'analisi filogenetica delle regioni NS5B e NS3 dimostra che APPV-LA/4911/2016 clusterizza con il *clade* degli stipiti tedeschi, e mostra la più elevata similarità con gli stipiti ungheresi. Inoltre, limitatamente alla regione NS3, appare piuttosto simile anche ad isolati italiani precedentemente identificati, mentre è geneticamente distante dal cluster degli stipiti cinesi, a conferma della elevata variabilità genetica di APPV. Questi dati dimostrano che APPV circola in Italia almeno dal 2016, probabilmente introdotto in seguito a scambi commerciali intracomunitari di suini e/o prodotti derivati. Inoltre, la presenza del virus in suini asintomatici potrebbe essere dovuta alla sua capacità di indurre una infezione persistente, che permette il mantenimento e la diffusione della infezione. Infine, non è da sottovalutare il probabile ruolo di APPV come *door-opener*, in caso di co-infezione con altri agenti patogeni del suino.

PAROLE CHIAVE

Atypical Porcine Pestivirus; virus emergente; Italia; caratterizzazione molecolare.

INTRODUZIONE

Al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*, appartengono virus dal notevole impatto socio-economico sul comparto zootecnico. Le quattro specie principali sono rappresentate dal virus della Diarrea virale bovina (BVDV-1 e BVDV-2), dal virus della Peste suina classica (PSC) e dal virus della Border disease (BD)¹. Nel 2017 queste specie sono state rinominate, rispettivamente, come Pestivirus A, Pestivirus B, Pestivirus C e Pestivirus D². A questi si sono aggiunti, nel corso del tempo, nuovi e distinti *Pestivirus*, in grado di infettare specie animali diverse con segni clinici variabili: Pestivirus F (Bungowannah virus), Pestivirus G (giraffe Pestivirus), Pestivirus I (Aydin-like), Pestivirus J (rat Pestivirus), Pestivirus E (pronghorn antelope Pestivirus), Pestivirus H (Hobi-like), e Pestivirus K (Atypical porcine pestivirus, APPV)²⁻⁵. Quest'ultimo è stato individuato per la prima volta nel 2015 negli USA attraverso metodiche metagenomiche in campioni di siero suino⁵. Nel 2016 la sua presenza è stata associata a forme di tremore congenito (CT) in suinetti neonati mediante riproduzione sperimentale della malattia⁶. In caso di CT, a causa della ipomielinizzazione del sistema nervoso, i suinetti manifestano tremori musco-

lari, incapacità nel muoversi/alzarsi e nell'alimentarsi col latte materno^{7,8}; i neonati più gravemente ammalati vengono a morte in breve tempo. Alcuni autori hanno dimostrato la presenza di APPV anche in suini apparentemente sani^{9,10}, oltre che in suinetti affetti da CT^{11,12}. Tra gli anni 2015 e 2018, APPV è stato identificato nei suini domestici in Germania¹³, Austria¹⁴, Svizzera¹⁵, Spagna⁹, Paesi Bassi⁷, Brasile¹⁶, Cina¹⁷, Ungheria¹⁸, Canada¹⁹, Regno Unito²⁰, Svezia²¹, nonché nei cinghiali in Spagna²², Germania e Serbia²³, dimostrando che il virus è ampiamente distribuito in tutto il mondo. In Italia APPV è stato segnalato per la prima volta nel 2017, in sieri di suini clinicamente sani¹⁰ ed è stato identificato anche in organi di feti suini abortiti (Dr.ssa E. Sozzi, comunicazione personale). APPV possiede un genoma a RNA singolo filamento a polarità positiva (+ SS), dalla lunghezza variabile tra 11-12 kb. Un lungo Open Reading Frame (ORF) codifica per una poliproteina costituita da circa 3635 amminoacidi, che viene processata in 4 proteine strutturali (C, Erns, E1, E2) e 8 non strutturali (Npro, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)⁵. Le regioni maggiormente indagate dal punto di vista filogenetico sono NS2, NS3, NS5, anche se non mancano lavori che riportano indagini molecolari su altre regioni, come ORF, Npro ed Erns²⁴. I diversi stipiti di APPV finora indagati sono significativamente distinguibili dagli altri *Pestivirus* nella loro sequenza genomica²⁵. Al contempo, diversi studi di sequenziamento hanno dimostrato la notevole variabilità genetica di APPV¹⁰. In particolare, è stata evidenziata una variabilità

Corresponding Author:
Gian Mario De Mia (gm.demia@izsum.it).

elevata, tra 81% e 87%, all'interno di una stessa area geografica, per esempio tra stipiti provenienti da differenti aziende di un territorio, mentre, per quanto riguarda gli stipiti circolanti nella stessa azienda, in alcuni casi è stata evidenziata una netta omologia virale, in altri è stata dimostrata la presenza contemporanea di differenti stipiti virali^{13,26}. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di effettuare una indagine virologica volta ad accertare la presenza del virus APPV in allevamenti del Centro Italia, con particolare riferimento ad aziende da riproduzione.

MATERIALI E METODI

Campioni di sangue

Sono stati analizzati retrospettivamente 1665 sieri di suini adulti, provenienti da aziende da riproduzione casualmente selezionate nelle regioni Umbria e Marche (1280 campioni), Lazio (49 campioni) e Abruzzo (336 campioni) e prelevati nel triennio 2016-2018.

Scheda di indagine epidemiologica

È stata creata una apposita scheda di indagine epidemiologica, da impiegare a posteriori in caso di positività, suddivisa in 8 sezioni. Le prime tre contengono informazioni generali (dati anagrafi, gestione dei nati, censimento e distribuzione dei suini in azienda); la sezione 4 raccoglie i dati relativi all'applicazione di misure di biosicurezza nella conduzione aziendale; le sezioni 5 (stato sanitario) e 6 (dinamica di infezione per APPV) raccolgono i dati anamnestici relativi sia alle patologie riscontrate in azienda sia alla eventuale presenza di CT; le ultime due sezioni comprendono la planimetria dell'azienda e le conclusioni del veterinario compilatore.

Estrazione, amplificazione, sequenziamento ed analisi filogenetica

I campioni prelevati sono stati sottoposti dapprima ad estrazione dell'RNA virale in pool da 8 sieri cadauno, mediante QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen) secondo le indicazioni del produttore; in caso di positività del pool, i singoli campioni sono stati estratti mediante QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), seguendo le istruzioni dello stesso. Gli estratti sono stati inizialmente analizzati mediante una real-time RT-PCR APPV specifica di screening²⁶; successivamente i campioni positivi sono stati confermati attraverso una ulter-

riore real-time RT-PCR APPV⁶ e caratterizzati mediante amplificazione delle regioni NS5B¹³ e NS3²⁶. Primers e probes impiegati in questo lavoro sono riportati nella Tabella 1. I prodotti di PCR attesi sono stati ritagliati, purificati, quantificati e sequenziati direttamente, utilizzando il kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 in un ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze sono state assemblate usando il software Lasergene SeqMan (DNASTAR USA), ed ogni dataset è stato allineato con le sequenze di riferimento presenti in GenBank usando il metodo Clustal X V.1.83. I datasets di sequenze sono stati analizzati mediante il software BioEdit V.2.1. Per ogni regione indagata, l'albero filogenetico è stato costruito con il software Mega V.7, utilizzando il metodo di Maximum Likelihood (ML). La validità dell'analisi filogenetica e la robustezza degli alberi sono state determinate effettuando una analisi di bootstrapping su 10.000 replicati.

RISULTATI

Lo screening effettuato nelle Regioni Umbria e Marche non ha evidenziato alcuna positività virologica per APPV, così come i campioni dell'Abruzzo, che si sono rivelati tutti negativi. Al contrario, l'analisi dei campioni provenienti dal Lazio ha dimostrato la presenza di APPV in un unico suino, rappresentato da un lattone di circa 70 giorni di età. L'azienda di origine esegue cicli di riproduzione aperti, con vendita di riproduttori. La successiva indagine epidemiologica ha dimostrato l'assenza di forme di CT, attuali e pregresse nei suinetti neonati, nonché l'assenza di segni correlati, riferibili agli animali adulti. Il campione positivo, denominato APPV-LA/4911/2016, è stato sottoposto ad analisi filogenetica per le due regioni genomiche di APPV maggiormente informative, NS5B (560 bp) e NS3 (805 bp). Lo stipite APPV-LA/4911/2016 clusterizza con isolati precedentemente identificati in Germania¹⁴, con una percentuale di identità del 95,40-98,10% (Fig. 1). L'analisi della regione NS3 (Fig. 2) conferma l'attribuzione al cluster rappresentato da isolati provenienti dalla Germania e dall'Ungheria¹⁸; in particolare lo stipite APPV-LA/4911/2016 mostra la più elevata identità con l'isolato HUN Jasz 1 (98,80%). Inoltre l'isolato APPV-LA/4911/2016 mostra una certa divergenza con gli stipiti virali precedentemente identificati in Italia¹⁰, con una percentuale di similarità del 90,20-94,70%. Per entrambe le regioni, APPV-

Tabella 1 - Primers e probes usate per PCR diagnostiche e di sequenziamento.

Primer & probe	Sequenza (5'-3')	Target	Impiego	Referenza
APPV_5587_fw	CAGAGRAAAGGKCGAGTG	NS3	PCR screening	26
APPV_5703_rev	ACCATAYTCTTGGCCTGSAG			
APPV_CT-59 probe	[6FAM] ACTACTATCCTTCGGGGGTAGTACCGA [BHQ1]			
Pesti_6332_F	TGCCTGGTATTCGTGGC	NS3	PCR conferma	6
Pesti_6455_R	TCATCCCATGTTCCAGAGT			
Pesti_6351_Probe	/5Cy5/CCTCCGTCTCCGCGGCTTCTTTGG /3BHQ_2/			
Pesti_11453_F	ACAGCMATRCCAAARAATGAGAA	NS5	Sequenziamento	13
PestiV NS5-R	AAGCCRTCRTCICRCASACGTG			
APPV_4186-fw	GTGCGGCCTCCCAACTGTAG	NS3	Sequenziamento	26
APPV_5169-rev	ACGTCACCCTCTTCCGCTC			

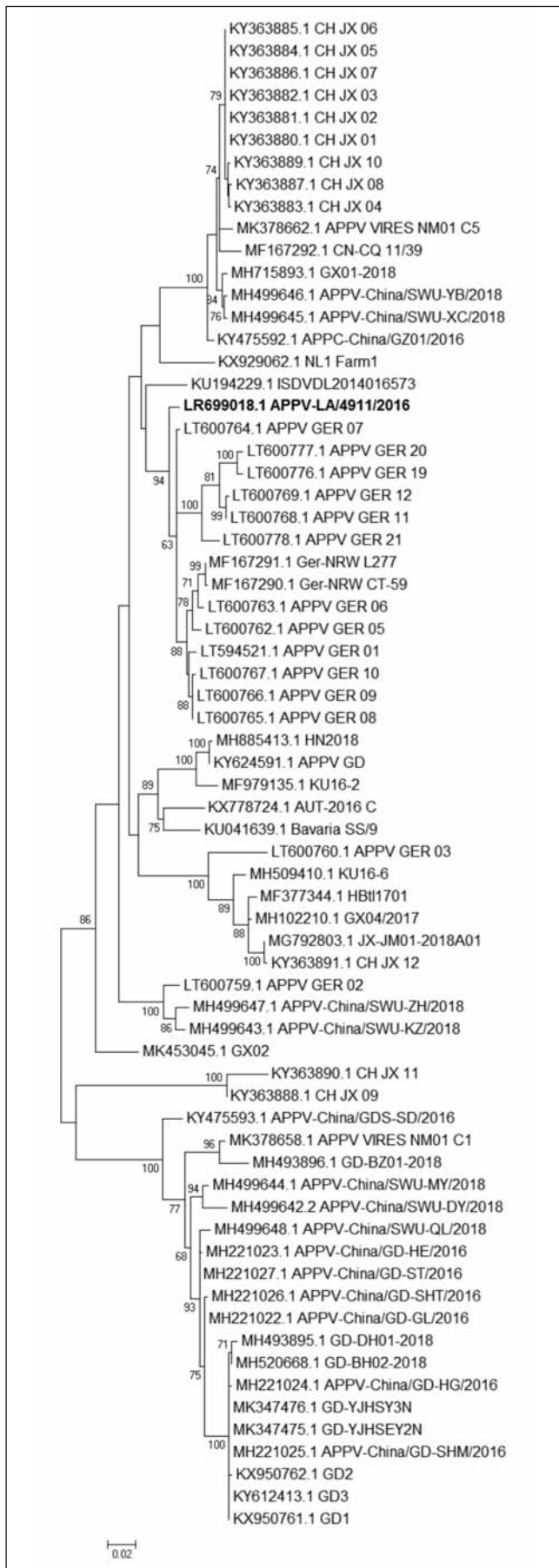


Figura 1 - Albero filogenetico costruito su una porzione (801 nt) del gene codificante la poliproteina NS5B di APPV mediante il metodo Maximum Likelihood (ML) utilizzando il software MEGA v.7.0. Sono mostrati i valori di bootstrap > al 60% (in % su 10.000 replicati). Bar: numero di sostituzioni per sito. In grassetto il campione caratterizzato nello studio.

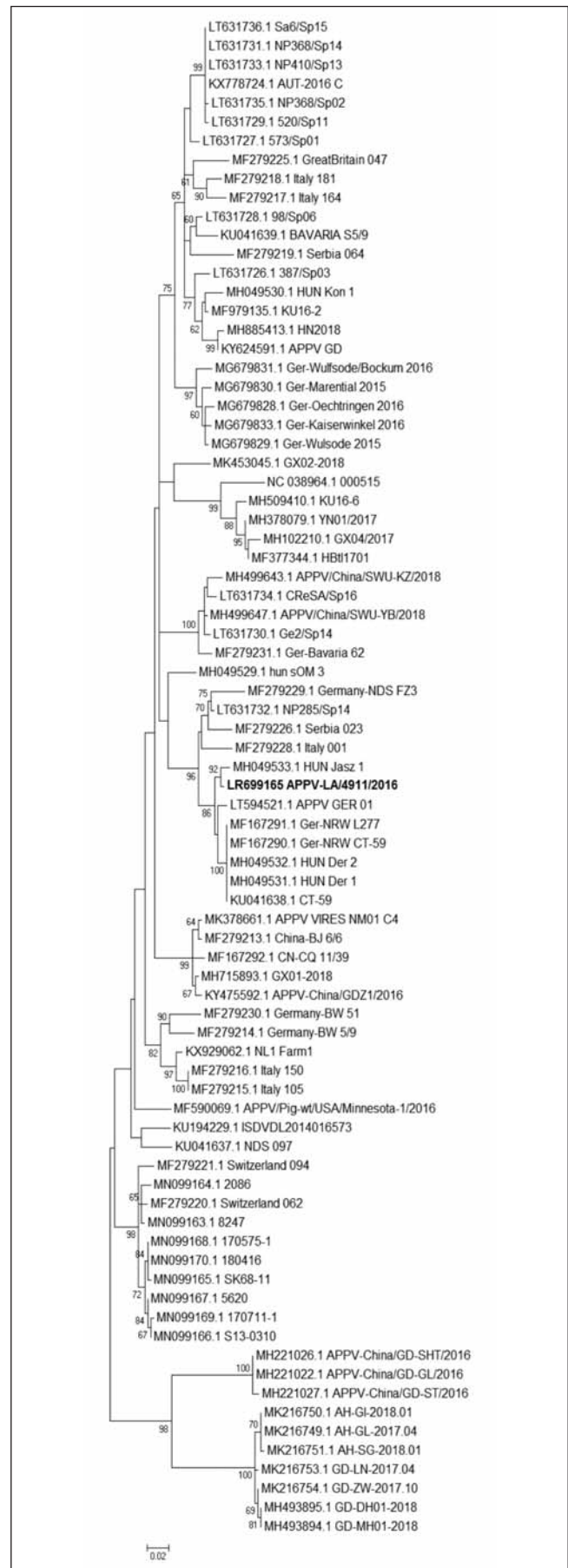


Figura 2 - Albero filogenetico costruito su una porzione (400 nt) del gene codificante la poliproteina NS3 di APPV mediante il metodo Maximum Likelihood (ML) utilizzando il software MEGA v.7.0. Sono mostrati i valori di bootstrap > al 60% (in % su 10.000 replicati). Bar: numero di sostituzioni per sito. In grassetto il campione caratterizzato nello studio.

LA/4911/2016 mostra invece la più elevata divergenza con isolati cinesi (rispettivamente, 83,10% in NS5B e 84,40-85,20% in NS3). Le sequenze sono state depositate in GenBank (acc. nrs. LR 699018 e LR699165).

DISCUSSIONE

APPV è un Pestivirus emergente, individuato per la prima volta nel suino nel 2015 mediante tecniche di metagenomica. In questo studio, in seguito a una indagine randomizzata, è stato identificato e caratterizzato nel 2016 uno stipite di APPV da un suino apparentemente sano proveniente da un allevamento del centro Italia, denominato APPV-LA/4911/2016. Nel nostro Paese, APPV era già stato segnalato in precedenza e questo lavoro ne conferma la presenza nella popolazione suina. D'altra parte, ad oggi, l'esistenza di APPV è stata documentata in più di 10 paesi in Europa, Asia e Americhe. Sebbene la scoperta di APPV sia avvenuta recentemente, ciò non implica che il virus non abbia potuto circolare nelle decenni precedenti, come è stato anche ipotizzato da alcuni autori¹⁸. Studi retrospettivi realizzati in Svizzera¹⁵ e in Spagna⁹ hanno dimostrato la presenza di APPV in campioni collezionati negli anni '80 e '90, rispettivamente. In questo lavoro, su un totale di 1665 sieri testati, uno solo è stato riscontrato come APPV positivo. La bassa prevalenza riscontrata potrebbe spiegarsi col fatto che nelle aziende da riproduzione, più che in quelle da ingrasso, le misure di biosicurezza sono in genere applicate con maggiore severità, per evitare l'introduzione di patogeni dall'esterno. Inoltre, la probabilità di trovare una positività in soggetti adulti è ragionevolmente attesa come inferiore. APPV viene associato a forme di CT nei suinetti neonati, sebbene anche suini e cinghiali adulti, apparentemente sani, siano stati trovati positivi. Il campione APPV-LA/4911/2016 deriva da un capo asintomatico proveniente da una azienda che non riferisce una storia anamnestica di CT, e resta da spiegare il ruolo svolto da APPV in questi casi. Come per altri *Pestivirus*, è stato ipotizzato che anche APPV possa essere in grado di stabilire la condizione di infezione persistente che giocherebbe un ruolo fondamentale nella trasmissione e nel mantenimento della infezione in azienda²⁵. I sintomi clinici di CT nei suinetti neonati compaiono nei casi di infezione del feto prima che questo sviluppi competenza immunitaria. Nei suinetti che sopravvivono, i sintomi scompaiono con la crescita, ma l'animale eliminerà il virus nell'ambiente per un periodo di tempo variabile e ancora non definito¹⁵. In particolare, alcuni studi hanno dimostrato che suini di circa 15 giorni non presentavano segni clinici riferibili a CT pur essendo viremic⁹. In questa condizione, essi potrebbero crescere senza evidenza di sintomi clinici né produzione di anticorpi e, nel contempo, diffondere il virus nell'ambiente, mantenendo l'infezione. APPV presenta un elevato grado di variabilità genetica tra gli stipiti, anche all'interno di uno stesso territorio. Sebbene due degli stipiti virali identificati in Italia, Italy 001/2015 e APPV-LA/4911/2016, risultino correlati tra loro, facendo supporre una probabile origine comune, altri stipiti italiani sono invece geneticamente divergenti, facendo ipotizzare più di una introduzione anche nel nostro Paese. Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, lo stipite APPV-LA/4911/2016 è risultato strettamente legato dal punto di vista genetico ad isolati identificati precedentemente in Ger-

mania ed in Ungheria. Considerati i frequenti rapporti commerciali che l'Italia intrattiene, in special modo con la Germania, si può speculare sul fatto che tale stipite possa essere stato introdotto da uno di questi Paesi, sebbene non esista alcuna riprova di ciò. Lo stipite APPV-LA/4911/2016, d'altro canto, è geneticamente molto distante dal gruppo degli isolati cinesi, avvalorando la tesi di una origine univoca, almeno per i ceppi europei che risultano simili tra loro. Se ciò fosse vero, il *clade* degli isolati cinesi potrebbe pertanto derivare da un comune e diverso *ancestor* genetico. In generale, la elevata diversità genetica dimostrata da APPV potrebbe essere la conseguenza non solo del tasso di evoluzione virale ma anche del processo di globalizzazione in zootecnia, che ne ha favorito la diffusione mediante la movimentazione di animali vivi e di carni suine.

CONCLUSIONI

APPV appare ben stabilito nella popolazione suina domestica di differenti paesi in Europa, Asia e Americhe, dove probabilmente risiede da qualche decennio, sebbene sia stato possibile rilevarlo solo negli ultimi anni. Una così ampia diffusione a livello globale sarebbe pertanto da attribuire alla commercializzazione su vasta scala di animali e prodotti animali, che è andata aumentando esponenzialmente nel tempo. La presenza del virus nella popolazione suinicola di tre continenti rende necessario quantificare l'impatto economico della infezione da APPV. Il virus è stato per il momento associato a forme di CT, una condizione che interferisce con l'alimentazione dei suinetti neonati e ne incrementa il tasso di mortalità sotto scrofa. La presenza di animali viremici e apparentemente sani pone inoltre importanti interrogativi sul reale ruolo patogenetico del virus che non è ancora sufficientemente chiaro. In particolare, l'associazione talvolta riscontrata con altri patogeni del suino^{21,27,28,29}, pone la questione circa la possibilità che APPV possa svolgere un effetto *door opener* o sinergico nel determinismo di alcune patologie, come già è stato ampiamente dimostrato per altri *Pestivirus*. A questo riguardo, ulteriori studi si renderanno pertanto necessari per approfondire, tra gli altri, temi quali origine, diffusione e ruolo patogenetico di questo virus emergente.

■ Identification and molecular characterization of *Atypical Porcine Pestivirus (APPV)* in central Italy

SUMMARY

A novel atypical porcine pestivirus (APPV), firstly discovered in USA in 2015 and now called Pestivirus K, was subsequently reported in Europe and Asia, both in pigs and in wild boars, sometimes associated with congenital tremor (CT) clinical signs in piglets. In this study, a virological survey was performed in central Italy to investigate the presence of APPV genome. One APPV strain was detected by Real Time RT-PCR and named APPV-LA/4911/2016. It comes from an adult and asymptomatic pig, living in a breeding herd from Lazio region, without any anamnestic CT history. Sequences from NS5B and NS3 genomic regions were submitted to phylogenetic analysis. APPV-LA/4911/2016 clustered to-

gether with the corresponding NS5B and NS3 fragments of some German APPV strains and showed the highest similarity with APPV strains from Hungary. In addition, it is very genetically divergent from Chinese APPV strains. These data confirm the high APPV genetic diversity, not being able to cluster this virus according to the geographic area. Of course, APPV-LA/4911/2016 is similar to some Italian strains, already identified, for NS3 region. These results showed that APPV has been circulating in Italy at least since 2016 and it has been involved in a probable multiple introduction in our country. The animal and swine products trade movements and the global pig transport could have allowed the spread of APPV in different countries of three continents, as well as the introduction of APPV in Italy. Therefore, APPV presence in asymptomatic pigs could be assigned mainly to its capability to induce a persistent infection, required for disease maintenance and spread. In the same time, APPV could be a door opener virus, like the most of Pestivirus, in case of coinfections with other swine pathogen agents. Further investigation should be performed to evaluate origin, epidemiological distribution, molecular evolution and pathogenetical role of this emerging swine virus.

KEY WORDS

Atypical porcine pestivirus; emerging virus; Italy; molecular characterization.

Bibliografia

- Blome S., Beer M., Wernike K. (2017). New leaves in the growing tree of pestiviruses. *Adv Virus Res*, 99: 139-160. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.07.003.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2018). ICTV Taxonomy History. Available at: (Accessed 29 August 2019). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus
- Kirkland P.D., Frost M.J., Finlaison D.S., King K.R., Ridpath J.F., Gu X. (2007). Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res*, 129 (1): 26-34.
- Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., Becher P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 286 (2): 456-465.
- Hause B.M., Collin E.A., Peddireddi L., Chen Z., Hesse R.A., Clement T., Fang Y., Anderson G. (2015). Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J Gen Virol*, 96 (10): 2994-2998. doi: 10.1099/jgv.0.000251.
- Arruda B.L., Arruda P.H., Magstadt D.R., Schwartz K.J., Dohlman T., Schleinig J.A., Patterson A.R., Visek C.A., Victoria J.G. (2016). Identification of a divergent lineage porcine Pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *PLoS ONE* 11(2): e0150104. doi:10.1371/journal.pone.0150104
- De Groof A., Deijs M., Guelen L., van Grinsven L., van Os-Galdos L., Vogels W., Derks C., Crujisen T., Geurts V., Vrijenhoek M., Suijskens J., van Doorn P., van Leengoed L., Schrier C., van der Hoek L. (2016). Atypical Porcine Pestivirus: A Possible Cause of Congenital tremor Type A-II in Newborn Piglets. *Viruses*, 8 (10), 271; doi:10.3390/v8100271.
- Done J.T., Woolley J., Upcott D.H., Hebert C.N. (1986). Porcine congenital tremor type AII: Spinal cord morphometry. *Br Vet J*, 142 (2): 145-150.
- Munoz-Gonzales S., Canturri A., Perez-Simo M., Bohorquez J.A., Rossell R., Cabezon O., Segales J., Domingo M., Ganges L. (2017). First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. *Transbound Emerg Dis*, 64 (6): 1645-1649. doi:10.1111/tbed.12699.
- Postel A., Meyer D., Cagatay G.N., Feliziani F., De Mia G.M., Fischer N., Grundhoff A., Milicevic V., Deng M.C., Chang C.Y., Qiu H.J., Sun Y., Wendt M., Becher P. (2017). High Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. *Emerg Infect Dis*, 23 (12), 2104-2107. doi: 10.3201/eid2312.170951.
- Gatto I.R.H., Harmon K., Bradner L., Silva P., Linhares D.C.L., Arruda P.H., de Oliveira L.G., Arruda B.L. (2018). Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. *Transbound Emerg Dis*, 65 (2): 375-380. doi: 10.1111/tbed.12824.
- Zhang K., Wu K., Liu J., Ge S., Xiao Y., Shang Y., Ning Z. (2017). Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. *Transbound Emerg Dis*. 64 (4): 1020-1023. doi: 10.1111/tbed.12659.
- Beer M., Wernike K., Dragger C., Hoper D., Pohlmann A., Bergermann C., Schroder C., Klinkhammer S., Blome S., Hoffmann B. (2017). High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany. *Transbound Emerg Dis*, 64 (5): e22-e26. doi:10.1111/tbed.12532.
- Schwarz L., Riedel C., Hogler S., Sinn L. J., Voglmayr T., Wochtl B., Dinhopf N., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., Ladinig A., Rumenapf T., Lamp B. (2017). Congenital infection with atypical porcine Pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet Res*, 48 (1), 1. doi 10.1186/s13567-016-0406-1.
- Kaufmann C., Stalder H., Sidler X., Renzullo S., Gurtner C., Grahofner A., Schweizer M. (2019). Long-Term Circulation of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) within Switzerland. *Viruses*, 11 (7), 653. doi:10.3390/v11070653.
- Mosena A.C.S., Weber M.N., da Cruz R.A.S., Cibulski S.P., da Silva M.S., Puhl D.E., Hammerschmitt M.E., Takeuti K.L., Driemeier D., de Barcellos D.E.S.N., Canal C.W. (2017). Presence of atypical porcine Pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound Emerg Dis*, 65 (1): 22-26. doi: 10.1111/tbed.12753.
- Yuan J., Han Z., Li J., Huang Y., Yang J., Ding H., Zhang J., Zhu M., Zhang Y., Liao J., Zhao M., Chen J. (2017). Atypical Porcine Pestivirus as a Novel Type of Pestivirus in Pigs in China. *Front Microbiol*, 8: 862. doi:10.3389/fmicb.2017.00862.
- Denes L., Biksi I., Albert M., Szeredi L., Knapp D.G., Szilasi A., Balint A., Balka G. (2018). Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary. *Transbound Emerg Dis*, 65 (6): 2039-2042. doi:10.1111/tbed.12981.
- Dessureault F.G., Choinière M., Provost C., Gagnon C.A. (2018). First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada. *Can Vet J*, 59 (4): 429-432.
- Williamson S. (2017). Congenital tremor associated with atypical porcine pestivirus. *Vet Rec*, 180 (2): 42-43. doi: 10.1136/vr.j121.
- Blomström A.L., Fossum C., Wallgren P., Berg M. (2016). Viral metagenomic analysis displays the co-infection situation in healthy and PMWS affected pigs. *PLoS ONE* 11(12): e0166863. doi:10.1371/journal.pone.0166863.
- Colom-Cadena A., Ganges L., Muñoz-González S., Castillo-Contreras R., Bohórquez J.A., Rosell R., Segalés J., Marco I., Cabezon O. (2018). Atypical porcine pestivirus in wild boar (*Sus scrofa*), Spain. *Vet Rec*, 183 (18): 569. doi: 10.1136/vr.104824.
- Cagatay G.N., Antos A., Meyer D., Maistrelli C., Keuling O., Becher P., Postel A. (2018). Frequent infection of wild boar with atypical porcine Pestivirus (APPV). *Transbound Emerg Dis*, 65: 1087-1093. doi:10.1111/tbed.12854.
- Pan S., Yan Y., Shi K., Wang M., Mou C., Chen Z. (2019). Molecular characterization of two novel atypical porcine pestivirus (APPV) strains from piglets with congenital tremor in China. *Transbound Emerg Dis*, 66 (1): 35-42. doi: 10.1111/tbed.13029.
- Pan S., Mou C., Chen Z. (2019). An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV). *Rev Med Virol*, 29 (1): e2018. doi: 10.1002/rmv.2018.
- Postel A., Hansmann F., Baechlein C., Fischer N., Alawi M., Grundhoff A., Derking S., Tenhundfeld J., Pfankuche V.M., Herder V., Baumgartner W., Wendt M., Becher P. (2016). Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep*, 6:27735. doi: 10.1038/srep27735.
- Yan X.L., Li Y.Y., He L.L., Wu J.L., Tang X.Y., Chen G.H., Mai K.J., Wu R.T., Li Q.N., Chen Y.H., Sun Y., Ma J.Y. (2019). 12 novel atypical porcine pestivirus genomes from neonatal piglets with congenital tremors: A newly emerging branch and high prevalence in China. *Virology*, 533: 50-58. doi: 10.1016/j.virol.2019.04.010.
- Chen F., Knutson T.P., Braun E., Jiang Y., Rossow S., Marthaler D.G. (2019). Semi-quantitative duplex RT-PCR reveals the low occurrence of Porcine Pestivirus and Atypical Porcine Pestivirus in diagnostic samples from the United States. *Transbound Emerg Dis*, 66 (3): 1420-1425. doi:10.1111/tbed.13154.
- Possatti F., Headley S.A., Leme R.A., Dall Agnol A.M., Zotti E., de Oliveira T. E. S., Alfieri A. F., Alfieri A. A. (2018). Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. *Transbound Emerg Dis*, 65 (2): 331-337. doi:10.1111/tbed.12807.