

INFEZIONI DA PCV2, PCV3 E PORCINE CIRCOVIRUS-LIKE VIRUS P1 NEI SUINI DI ALLEVAMENTO E NEI CINGHIALI SELVATICI

INFECTIONS BY PCV2, PCV3 AND CIRCOVIRUS-LIKE VIRUS P1 IN FARMED SWINE AND WILD BOARS

FACCINI S., FERRARINI G., BARBIERI I., BONIOTTI M.B., ALBORALI L.G., LUPPI A., CHIAPPONI C., BONILAUDI P., GRADASSI M., VENTURA G., MORENO A., GIBELLI L.R., PEZZONI G., ROSIGNOLI C.

Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: PCV2, PCV3, porcine circovirus-like virus P1

Key words: PCV2, PCV3, porcine circovirus-like virus P1

RIASSUNTO

Sono presentati i dati raccolti nell'ambito del progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute sulle infezioni da PCV2, PCV3 e porcine circovirus-like virus P1 nei suini di allevamento e cinghiali selvatici. Sono stati analizzati campioni conferiti presso le sedi territoriali dell'IZSLER per monitoraggio periodico o diagnosi di patologia da dicembre 2017 e dicembre 2019. I dati raccolti dimostrano l'attiva circolazione di PCV3 nelle due popolazioni, senza evidenziare stretta relazione tra infezione e patologia. Si è confermata, invece, una correlazione tra titoli virali elevati per PCV2 ($>10^6$ copie/mL o g di tessuto) e la presenza di patologia nei suini di allevamento. Inoltre, la positività a PCV2 e i titoli virali sono risultati significativamente più bassi nei suini d'allevamento rispetto ai cinghiali selvatici mettendo in luce l'efficacia della vaccinazione. PCV2d è risultato il genotipo prevalente (67.65%), negli allevamenti, mentre nei cinghiali selvatici è prevalente il PCV2b (59.68%). In due allevamenti è stata inoltre riscontrata la circolazione di PCV2a, assente nei cinghiali selvatici analizzati. Porcine circovirus-like virus P1 descritto in Cina, dove circola almeno dal 2005, non è stato rilevato in nessuna delle due popolazioni oggetto di studio. I dati raccolti necessitano di ulteriori elaborazioni, ma evidenziano la necessità di approfondire sempre più le conoscenze sui circovirus infettanti i suini, soprattutto in considerazione della natura multifattoriale delle malattie ad essi associate, che presentano tuttora numerosi aspetti sconosciuti.

SUMMARY

The study presents data collected as part of a research project, funded by the Ministry of Health, concerning infections by PCV2, PCV3 and porcine circovirus-like virus P1 on samples from farmed pigs and wild boars delivered to the territorial laboratories of the IZSLER for periodic monitoring or diagnosis of pathology from December 2017 and December 2019. The data obtained highlighted the intense circulation of PCV3 among farmed pigs and wild boars, without evidence of strict correlation between infection and disease. On the other hand, a correlation between high viral titers for PCV2 and disease conditions was confirmed. Moreover, the different prevalence of PCV2 in farmed pigs and wild boars highlighted the effectiveness of vaccination. PCV2d was the prevalent genotype (67.65%) in farmed pigs, while PCV2b was the most frequent in wild boars (59.68%) samples. PCV2a was found in two farms. Further analysis of the sequence data, it will significantly expand the value of the work. The presence of circovirus-like virus P1 was not detected neither in farmed pigs nor

in wild boars. The data presented require further processing, but highlight the necessity to deepen the knowledge on circoviruses infecting pigs.

INTRODUZIONE

Nonostante il successo della vaccinazione, PCV2 rappresenta ancora una minaccia importante per la salute e la produzione di suini in tutto il mondo (Afolabi, et al, 2017, Opriessnig and Langohr, 2013). La diversità e la natura multifattoriale delle malattie da circovirus (PCVD), la notevole variabilità genetica di PCV2 e l'assenza di immunità sterilizzante contribuiscono alla complessità del problema. Ne consegue che la comprensione dei fattori che determinano l'emergere di nuovi genotipi prevalenti sia di primaria importanza (Franzo, Giovanni, et al, 2016). PCV2 comunemente infetta anche i cinghiali. Pochi sono però gli studi di epidemiologia molecolare sulle infezioni da PCV2 nei cinghiali selvatici, o che confrontino i ceppi circolanti in campo in aziende vaccinate e non. Alcune analisi delle sequenze disponibili in GenBank suggeriscono la presenza di forze selettive dovute alla vaccinazione (Franzo, Giovanni, et al, 2016, Karuppanan and Opriessnig, 2017).

Fino ad alcuni anni fa, PCV2 era considerato l'unica specie del genere *Circovirus* patogena per i suini. Ma il quadro dei circovirus infettanti i suini si sta facendo più complesso. È stata infatti descritta una nuova specie di circovirus, Porcine Circovirus 3 (PCV3), associata a forme cliniche simili a PCVD (Palinski, et al, 2017, Phan, et al, 2016). In Cina inoltre è stato descritto un nuovo virus, non ancora classificato, caratterizzato da un genoma ridotto (648 nt), molto simile a PCV2 e per questo denominato porcine circovirus-like virus P1 (P1). Diffuso in Cina (Wen, et al, 2012, Wen, et al, 2018), è stato associato a simili a PCV-SD e a tremori congeniti. Nessuno studio, che ne confermi o ne smentisca la presenza in altre parti del mondo è stato fino ad ora pubblicato.

Nel 2019, inoltre è stato rilevato un ulteriore circovirus, denominato PCV4 in suini con forme respiratorie, diarrea e in alcuni casi lesioni della cute simili alla sindrome Dermatite-Nefrite (PDNS) (Zhang, et al, 2020). Un recente studio non ha dimostrato la presenza del nuovo virus in Italia e Spagna (Franzo, G., et al, 2020). PCV3, al contrario, può considerarsi un virus emergente. Indagini virologiche e sierologiche condotte negli Stati Uniti e in Cina e in numerosi paesi hanno evidenziato come PCV3 circoli comunemente nella popolazione suina, con una prevalenza dal 12 al 59% (Palinski, et al, 2017). Alcuni studi dimostrano che le infezioni subcliniche sono comuni (Stadejek, et al, 2017, Zheng, et al, 2018), ma in alcune condizioni PCV3 sembra essere l'agente eziologico di disturbi riproduttivi e di forme simili a malattia sistemica da circovirus (PCV-SD) e a PDNS (Ku, et al, 2017, Phan, et al, 2016, Palinski, et al, 2017). Non può essere dunque al momento scartata l'ipotesi che, come per PCV2 (Ellis, 2014), anche gli esiti delle infezioni da PCV3 e P1 siano influenzati da co-infezioni, super-infezioni, e fattori come le pratiche di allevamento e i protocolli di vaccinazione.

Da qui l'importanza di uno studio che consenta non solo di acquisire fondamentali informazioni sulla presenza, circolazione e patologie correlate alle infezioni da PCV2, PCV3 e P1 nei suini di allevamento e cinghiali selvatici.

MATERIALI E METODI

Suini da allevamento—Sono stati analizzati campioni conferiti alle sedi territoriali dell'IZSLER per la diagnosi di PCVD e per sorveglianza periodica (sulla base dei dati anamnestici), nel periodo da dicembre 2017 a dicembre 2019. *Animali selvatici (cinghiali)*— Sono stati analizzati campioni (polmoni, milza, linfonodi) da cinghiali conferiti ai laboratori diagnostici dell'IZSLER per la sorveglianza delle malattie infettive della fauna selvatica da dicembre 2017 a dicembre 2019. *Test diagnostici* — La ricerca di PCV2 è stata eseguita secondo quanto

precedentemente descritto (Opriessnig, et al, 2003). I campioni sono stati analizzati per PCV3 mediante Real-Time PCR utilizzando primer precedentemente descritti (Palinski, et al, 2017) ed una sonda Taqman appositamente disegnata. La ricerca di P1 è stata eseguita come precedentemente descritto (He, et al, 2015). Sono stati registrati eventuali agenti confettanti emersi dalle indagini diagnostiche, inoltre, in tutti i cinghiali ed in alcuni campioni di suini d'allevamento è stata ricercata la presenza di PPV1-6 secondo il protocollo descritto da Opriessnig et al. (2014). *Caratterizzazione molecolare dei ceppi*—La genotipizzazione dei ceppi di PCV2 mediante Real-Time PCR è stata effettuata secondo quanto precedentemente indicato (Opriessnig, et al, 2013, Opriessnig, et al, 2010). Sono stati inoltre disegnati alcuni primer da utilizzare come PCR end-point per la caratterizzazione di PCV2c. Per campioni positivi con Cq ≤ 30 a PCV2 o PCV3 è stato tentato il sequenziamento. Le sequenze di ORF2 e del genoma di ceppi di PCV3 sono state ottenute, mediante sequenziamento Sanger, secondo quanto indicato da Palinski et al. (2016 e 2017). *Analisi di sequenze*—L'allineamento delle sequenze è stato realizzando con ClustalW utilizzando MEGA6 (Tamura, et al, 2013) con il quale sono anche state effettuate le analisi filogenetiche preliminari.

RISULTATI

Suini da allevamento - Sono stati analizzati per PCV3, 1178 campioni (comprendenti sieri, linfonodi, tamponi nasali, fluidi orali, fluidi testicolari, tessuto cardiaco) di suini di allevamento. I campioni appartenevano a 511 conferimenti pervenuti presso le sedi territoriali IZSLER, provenienti da 207 allevamenti dislocati in 26 province italiane, principalmente nella Pianura Padana. I soggetti campionati comprendono tutte le fasi del ciclo produttivo, dai feti al finissaggio. Complessivamente il 32,09% dei campioni analizzati è risultato positivo per PCV3, il 36,79% dei conferimenti aveva almeno un campione positivo. In totale, nel 44,5% degli allevamenti campionati è stata dimostrata la presenza del virus. Organizzando i dati per le categorie di animali (Figura 1) si è osservato che la massima frequenza di campioni positivi è stata registrata nei suini sottoscrofa (58,36%), seguita da quella delle scrofette (46,1%) e delle scrofe (34,21%).

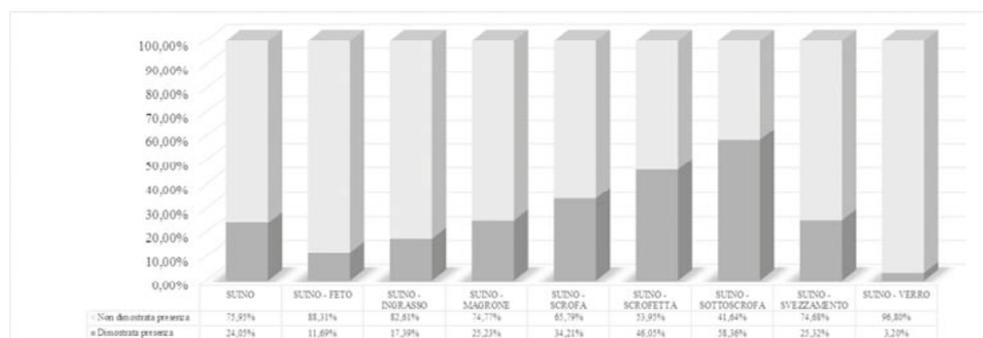


Figura 1: Frequenza campioni positivi a PCV3 nelle varie categorie di suini da allevamento. Nella categoria “SUINO” sono raccolti i campioni dei soggetti la cui età non era definita.

Figure 1: Frequency of PCV3 positive samples in the different categories of farmed pigs. In the “SUINO” category, samples of not classified subjects are collected.

Il 56,03% dei campioni analizzati per PCV3 apparteneva a conferimenti per monitoraggio, il 40,41% per diagnostica di patologie, mentre del 3,56% dei campioni non si avevano

informazioni sul motivo del conferimento. I campioni positivi rappresentano il 40.52% dei campioni per monitoraggio e 19.75% di quelli per patologia. I campioni sono stati classificati in base al titolo virale. Sia per i campioni per monitoraggio che per patologia i campioni negativi rappresentano la classe più frequente seguita da quella con titoli virali da 10^4 a 10^6 copie genoma/g o mL. Da sottolineare che in alcuni campioni di feti sono stati rilevati titoli virali $>10^{10}$ copie/g.

Sono stati analizzati per PCV2 704 campioni da suini di allevamento, provenienti da 161 allevamenti. Tutti gli allevamenti coinvolti seguivano un programma di vaccinazione per PCV2. Il 44% dei campioni era da conferimenti per monitoraggio, la restante per diagnosi di patologie. L'80,39% dei campioni analizzati è risultato negativo per PCV2. Suddividendo i campioni positivi in classi di positività è stata confrontata la distribuzione dei campioni conferiti per monitoraggio e quelli per diagnosi di patologie (Figura 2). Si è così evidenziato che i campioni conferiti per monitoraggio avevano titoli virali $<10^6$ copie/g o mL. La maggior parte dei campioni con titolo virale $>10^8$ copie/g o mL, invece, erano relativi a conferimenti per diagnosi di PCV-SD, mentre due casi si riferivano a feti. Per quanto riguarda i genotipi riscontrati, PCV2d (67.65%) è risultato il genotipo prevalente nei suini di allevamento, seguito da PCV2b (26.47%). In due allevamenti è stata riscontrata la circolazione di PCV2a, mentre in nessun campione, è stato rilevato PCV2c o altri genotipi. I campioni da soggetti con quadro tipico da PCVD, risultati negativi per PCV2 e PCV3 sono stati inoltre analizzati per la presenza di P1, con esito negativo. Per quanto riguarda l'analisi delle co-infezioni è possibile osservare che il 34,7% dei campioni positivi per PCV3 era anche positivo a PCV2. Si è evidenziato inoltre che nel caso di PCV2, le proporzioni di campioni positivi a PPV1, PPV2, PPV6 e PRRS sono significativamente più alte nei campioni con titoli virali elevati rispetto ai negativi e debolmente positivi.

Cinghiali selvatici - Sono stati inoltre analizzati per la presenza di PCV2, PCV3 e P1, 245 campioni di cinghiali selvatici provenienti da 7 province del nord d'Italia. Come per i suini di allevamento, anche nei cinghiali selvatici non è stata rilevata la presenza di P1. Tutti i cinghiali analizzati erano soggetti adulti che non hanno evidenziato lesioni macroscopiche riconducibili a patologie in sede autoptica. Il 53.47% dei campioni di tessuti prelevati dai cinghiali è risultato positivo per PCV3. Il 60.92% dei campioni di cinghiali selvatici è risultato positivo per PCV2. La suddivisione dei campioni in classi di positività per il virus PCV2, è stata confrontata con quella dei suini di allevamento (Figura 2).

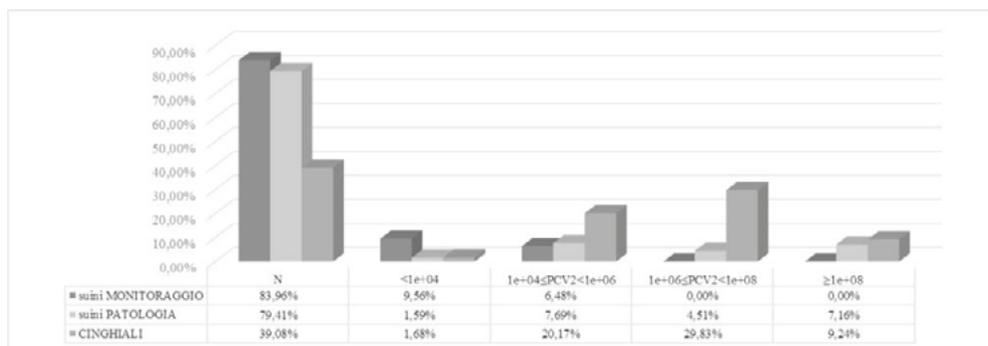


Figura 2: Classi di positività a PCV2 nei suini da allevamento per monitoraggio e patologia e nei cinghiali selvatici

Figure 2: Classes of PCV2 positivity in wild boars and farmed pigs with or without clinical signs.

Per quanto riguarda i genotipi riscontrati mediante Real-Time PCR e sequenziamento, PCV2b è il prevalente nei cinghiali selvatici (59.68%) rispetto al PCV2d (38.71%). Non sono stati rilevati ceppi PCV2c e PCV2a o altri genotipi in questa popolazione. Come per i suini d'allevamento, per l'analisi delle co-infezioni, occorreranno ulteriori elaborazioni statistiche dei dati. Come la positività a PCV2 e PCV3 anche la positività a PPV1, PPV2, PPV3 nei cinghiali è in generale più alta che nei suini.

Analisi filogenetiche - I primi dati delle analisi filogenetiche delle sequenze di ORF2 e dell'intero genoma dei ceppi di PCV2 e PCV3 ottenute dai suini da allevamento e dai cinghiali selvatici mostrano che nella maggior parte dei casi i ceppi circolanti nelle due popolazioni appartengono a clusters diversi, ma vi sono evidenze di possibili scambi tra le due popolazioni.

DISCUSSIONE

I dati raccolti nel presente progetto di ricerca hanno dimostrato l'attiva circolazione di PCV3 nei suini d'allevamento e nei cinghiali selvatici. In totale, nel 44.5% degli allevamenti campionati è stata dimostrata la presenza del virus. Complessivamente il 32,09% dei campioni analizzati è risultato positivo per PCV3, in particolare il 36.79% dei conferimenti aveva almeno un campione positivo. I dati sulla prevalenza di PCV3 riportati in letteratura, variano molto da studio e studio, ma sicuramente la positività riscontrata nell'area della Pianura Padana nel corso di questo progetto è molto alta. Uno studio sulla circolazione di PCV3 in allevamenti negli Stati Uniti ha rilevato una proporzione molto simile di allevamenti positivi a (44%) (Wang, et al, 2019). Molto importanti sono i dati raccolti relativamente alla ripartizione dei positivi nelle varie categorie di animali. La massima frequenza di campioni positivi è stata registrata nei suini sottoscrofa (58.5%), seguita da quella delle scrofette (46.05%) e delle scrofe (34.21%). Questo induce a pensare che l'infezione sia spesso molto precoce, entro i primi giorni di vita, o addirittura si può ipotizzare che molti suinetti nascano già infetti. I dati raccolti inoltre non emerge che l'infezione da PCV3 sia fortemente legata a forme cliniche. La positività è risultata infatti più alta nei soggetti campionati per monitoraggio (40.52%) rispetto a quelli per patologia (19.75%). Nemmeno l'analisi dei titoli virali dimostra che ci siano titoli virali significativamente più alti nei soggetti con patologia rispetto a quelli campionati per monitoraggio. Resta sicuramente da indagare la positività nei feti spesso con titoli virali molto elevati e nel siero di scrofe con aborto. Anche la positività nei tessuti dei cinghiali (53.47%), apparentemente in buone condizioni di salute, non supporta una correlazione dell'infezione con condizioni patologiche. All'inizio di questo studio nessun dato era stato pubblicato sull'infezione da PCV3 nei cinghiali selvatici. Recentemente sono stati resi disponibili i dati di due ricerche, una sui sieri di cinghiali del parco regionale dei colli Euganei (Franzo, Giovanni, et al, 2018) ed una effettuata su sieri e tessuti della popolazione di cinghiali della Catalogna (Klaumann, et al, 2019). La percentuale di campioni positivi riscontrata nella presente indagine (53.47%) è molto più alta di quella dei cinghiali del parco dei colli Euganei (circa 30%) ed è più simile a quella della Catalogna (53,66%). Come osservato negli altri studi, comunque, è possibile affermare che i dati si discostano da quanto rilevato nella popolazione dei suini di allevamento.

Diverso è il quadro che emerge dai dati di PCV2 raccolti sui campioni di suini da allevamento. L'80,39% dei campioni analizzati è negativo per PCV2 (79.05% dei campioni conferiti per diagnosi di patologie, 83.96% dei campioni conferiti per monitoraggio). Si è confermato, come più volte riportato in letteratura, che i campioni conferiti per monitoraggio hanno titoli virali $<10^6$ copie/g o mL. La maggior parte dei campioni con titolo virale $>10^8$ copie/g, invece, erano relativi a conferimenti per diagnosi di PCV-SD, mentre due casi si riferivano a feti.

L'infezione nei cinghiali selvatici è molto frequente: 53.47% dei campioni è risultato positivo.

Pur trattandosi di specie diverse, confrontato con la positività intorno al 20% nei suini d'allevamento il dato potrebbe essere ascrivibile all'effetto della vaccinazione, considerando anche che la proporzione di campioni con titoli virali da 10^4 a 10^6 copie/g e da 10^6 a 10^8 copie/g è significativamente maggiore nei cinghiali. Molto interessante è l'analisi dei genotipi riscontrati. Nei suini d'allevamento il genotipo prevalente è PCV2d (67.65%), seguito da PCV2b. In due allevamenti inoltre stata riscontrata la circolazione di PCV2a assente nei cinghiali. PCV2b è il genotipo preponderante nei cinghiali selvatici (59.68%) seguito dal PCV2d. PCV2c o altri genotipi non sono stati rilevati in nessuna delle due popolazioni.

Sia nei suini di allevamento, che nei cinghiali selvatici non è stato rilevato P1, mentre in Cina è stato riportato nel 19% circa dei campioni analizzati (Wen, et al, 2017).

Per quanto riguarda l'analisi delle co-infezioni, occorreranno ulteriori elaborazioni statistiche dei dati. È possibile comunque osservare che il 34,7% dei positivi a PCV3 era anche positivo a PCV2. Inoltre per PCV2, le proporzioni di campioni positivi a PPV1, PPV2, PPV6 e PRRS sono sensibilmente più alte nei campioni con titoli virali elevati rispetto ai negativi e debolmente positivi, a conferma di quanto già noto su questo virus.

CONCLUSIONI

I dati, raccolti nell'ambito di questo progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute (IZSLER2017007 RC), avvalorano la necessità di approfondire sempre più le conoscenze sui circovirus infettanti i suini, soprattutto per la natura multifattoriale delle malattie ad essi associate, che presentano tuttora numerosi aspetti sconosciuti.

BIBLIOGRAFIA

1. Afolabi K.O., B.C. Iweriebor, A.I. Okoh and L.C. Obi, 2017: Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa. *Adv. Virol.* 2017, 6807964.
2. Ellis J., 2014: Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Veterinary Pathology Online* 51, 315-327.
3. Franzo G., A. Ruiz, L. Grassi, M. Sibila, M. Drigo and J. Segales, 2020: Lack of Porcine circovirus 4 Genome Detection in Pig Samples from Italy and Spain. *Pathogens* 9, 10.3390/pathogens9060433.
4. Franzo G., C.M. Tucciarone, M. Cecchinato and M. Drigo, 2016: Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Scientific Reports* 6, 39458.
5. Franzo G., C.M. Tucciarone, M. Drigo, M. Cecchinato, M. Martini, A. Mondin and M.L. Menandro, 2018: First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs. *Transbound Emerg Dis* 65, 957-962.
6. He K.W., L.B. Wen, Y.S. Wang and C.P. Lu, 2015: Development of real-time PCR assay for detection of porcine circovirus-like virus P1 in domestic pigs in China. *BMC Vet. Res.* 11, 240-3.
7. Karuppanan A.K. and T. Opriessnig, 2017: Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses* 9, 10.3390/v9050099.
8. Klaumann F., F. Correa-Fiz, M. Sibila, J.I. Nunez and J. Segales, 2019: Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. *Vet. Rec.* 184, 619.
9. Ku X., F. Chen, P. Li, Y. Wang, X. Yu, S. Fan, P. Qian, M. Wu and Q. He, 2017: Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg. Dis.* 64, 703-708.

10. Opriessnig T. and I. Langohr, 2013: Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Vet. Pathol.* 50, 23-38.
11. Opriessnig T., J.R. Prickett, D.M. Madson, H.G. Shen, N.M. Juhan, R.R. Pogranichniy, X.J. Meng and P.G. Halbur, 2010: Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and reinoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet. Res.* 41, 31.
12. Opriessnig T., C.T. Xiao, P.F. Gerber and P.G. Halbur, 2013: Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet. Microbiol.* 163, 177-183.
13. Opriessnig T., S. Yu, J.M. Gallup, R.B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E.L. Thacker, C.W. Brockus, M.R. Ackermann, P. Thomas, X.J. Meng and P.G. Halbur, 2003: Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet. Pathol.* 40, 521-529.
14. Palinski R., P. Piñeyro, P. Shang, F. Yuan, R. Guo, Y. Fang, E. Byers and B.M. Hause, 2017: A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *Journal of virology* 91.
15. Phan T.G., F. Giannitti, S. Rossow, D. Marthaler, T.P. Knutson, L. Li, X. Deng, T. Resende, F. Vannucci and E. Delwart, 2016: Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J* 13.
16. Stadejek T., A. Woźniak, D. Milek and K. Biernacka, 2017: First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 1350-1353.
17. Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, 2013: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
18. Wang Y., L. Noll, N. Lu, E. Porter, C. Stoy, W. Zheng, X. Liu, L. Peddireddi, M. Niederwerder and J. Bai, 2019: Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transbound Emerg Dis* n/a.
19. Wen L., K. He, Q. Xiao, Z. Yu, A. Mao, Y. Ni, X. Zhang, B. Li, X. Wang, R. Guo, J. Zhou, L. Lv and J. Jiang, 2012: A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs. *PLoS One* 7, e41565.
20. Wen L., F. Jiao, D. Zhang, A. Mao, C. Liu, J. Xie and K. He, 2017: Genome sequence of a porcine circovirus-like virus P1 mutant in China. *Arch. Virol.* 162, 585-586.
21. Wen L., A. Mao, F. Jiao, D. Zhang, J. Xie and K. He, 2018: Evidence of porcine circovirus-like virus P1 in piglets with an unusual congenital tremor. *Transbound Emerg. Dis.* 65, e501-e504.
22. Zhang H.H., W.Q. Hu, J.Y. Li, T.N. Liu, J.Y. Zhou, T. Opriessnig and C.T. Xiao, 2020: Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg. Dis.* 67, 1057-1061.
23. Zheng S., J. Shi, X. Wu, Z. Peng, C. Xin, L. Zhang, Y. Liu, M. Gao, S. Xu, H. Han, J. Yu, W. Sun, X. Cong, J. Li and J. Wang, 2018: Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 327-330.