

Quantification du génome du circovirus porcin de type 2 (PCV2) par PCR en temps réel et corrélation avec la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP).

Philippe BLANCHARD (1), Christophe LOIZEL (1), Marie-Agnès BAUDOULARD (2), Anne Cécile NIGNOL (1), Béatrice GRASLAND (1), Daniel DORY (1), Hervé MORVAN (2), Roland CARIOLET (1), André JESTIN (1).

(1) AFSSA – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Zoopôle les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan.

(2) LDA 22 – Laboratoire de Développement et d'Analyses, Zoopôle le Sabot, BP 54, 22440 Ploufragan.

Quantification du génome du circovirus porcin de type 2 (PCV2) par PCR en temps réel et corrélation avec la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP)

Afin de pouvoir quantifier le génome viral du circovirus porcin de type 2 (PCV2) dans les tissus porcins, une PCR en temps réel a été mise au point, basée sur la technologie TaqMan, utilisant une sonde fluorescente (FAM-NFQ/MGB). La méthode permet la quantification absolue du PCV2 par rapport à une courbe standard. Les primers et la sonde ont été choisis dans le gène de la capsid virale du PCV2 (Orf2) et la courbe standard a été établie à partir du génome du PCV2 cloné dans un plasmide.

Les résultats ont montré une quantification linéaire du PCV2 sur 7 logs d'amplitude, avec une sensibilité de 10 copies, confirmée par une excellente reproductibilité inter- et intra-essai.

Cette méthode a été validée d'une part sur des échantillons de tissus provenant de porcs infectés expérimentalement par le PCV2, révélant jusqu'à 10^{12} copies de génome PCV2 par gramme de tissus, 17 jours post infection. D'autre part, l'analyse d'échantillons de tissus provenant de porcs d'élevages bretons a permis de mettre en évidence une corrélation entre les résultats histopathologiques (présence ou absence de lésions typiques de MAP) et la charge génomique PCV2, suggérant une valeur prédictive de la MAP à partir de 10^{11} copies de PCV2 par gramme de tissus.

Real time PCR quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) genome and correlation with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)

To quantify porcine circovirus type 2 (PCV2) genome in various tissue samples, a real-time PCR was developed, based on TaqMan methodology using a fluorescent probe-PCR (FAM-NFQ/MGB). Plasmid containing the PCV2 genome was used for the standardisation of the method, and allowed to obtain a PCV2 absolute quantification using a standard curve. This assay showed a linear detection over 7-log range ($R^2 > 0.99$) with a sensitivity over 10 copies, confirmed by a reliable inter-assay and intra-assay reproducibility.

PCV2 TaqMan PCR assay was evaluated from a PMWS experimental reproduction, revealing a PCV2 genome equivalent copy number up to 10^{12} copies per gram of tissue sample at 17 days post infection. These results were confirmed by a field study. 42 tissue samples collected from PMWS affected piglets presented a PCV2 genomic load ranging from 2.9×10^9 to 9.1×10^{13} copies per gram of tissue (maximum frequency of results at 10^{12} PCV2 copies number) while 37 tissue samples collected from PMWS-free piglets revealed a PCV2 genomic ranging from 0 to 6.1×10^{11} copies per gram of tissue (maximum frequency of results at 10^7 PCV2 copies number). A strong correlation between PCV2 genomic load and PMWS diagnosis was found, suggesting a predictive value for PMWS evaluated at 10^{11} copies number per gram of tissue.

INTRODUCTION

La maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) a été décrite en France en 1996 (MADEC et al., 1999). Le circovirus porcine de type 2 (PCV2) est désormais considéré comme un élément déterminant dans l'étiologie de cette pathologie (ALLAN et al., 1998 ; HAMEL et al., 1998 ; MEEHAN et al., 1998 ; MOROZOV et al., 1998). Le rôle pivot du PCV2 dans la reproduction expérimentale de la maladie a depuis été démontré (ELLIS et al., 1999 ; BALASCH et al., 1999 ; ALBINA et al., 2001). Cependant, de nombreux travaux ont rapporté la présence du génome du PCV2 dans des sérums ou des tissus de porcs cliniquement sains (LIU et al., 2000 ; QUINTANA et al., 2001 ; LAROCHELLE et al., 2003). D'autres études ont montré le rôle important de la charge génomique du PCV2 dans la reproduction de la pathologie (LIU et al., 2000 ; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001 ; MEEHAN et al., 2001 ; ROVIRA et al., 2002).

Depuis plusieurs années, les méthodes de PCR en temps réel (méthodologie TaqMan) ont largement été développées, permettant de détecter et de quantifier différents types de génomes viraux (ARGAW et al., 2002 ; MARKOWSKI-GRIMSUD et al., 2002 ; MOEN et al., 2002). Cette méthode est basée sur l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq polymérase et sur l'utilisation d'une sonde fluorescente doublement marquée (HOLLAND et al., 1991 ; LIVAK et al., 1995 ; HEID et al., 1996). Dans notre étude, nous avons choisi de développer une méthode PCR en temps réel utilisant une sonde TaqMan de type MGB (Minor Groove Binder). En stabilisant l'ADN double brin, le MGB augmente la température de fusion de la sonde (T_m) sur sa cible, permettant de réduire sa taille. Ce type de sonde a montré une meilleure sensibilité ainsi qu'un faible bruit de fond fluorescent, comparée à une sonde sans MGB (KUTYAVIN et al., 2000).

La méthode décrite dans cette étude est basée sur la quantification du génome du PCV2 par rapport à une courbe standard obtenue à partir du génome du PCV2 cloné dans un plasmide. La sensibilité, la spécificité et la reproductibilité ont été évaluées puis validées dans un contexte expérimental sur des échantillons de tissus provenant de porcelets infectés PCV2. Des échantillons de tissus provenant d'animaux d'élevage autopsiés au laboratoire d'analyses LDA 22 ont été analysés afin d'évaluer la corrélation entre les résultats histopathologiques (absence ou présence de lésions typiques liées à l'expression de la MAP) et la charge génomique du PCV2.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Choix des amorces et de la sonde

Le design des amorces et de la sonde a été réalisé à l'aide du logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). Les amorces choisies dans le gène de la capsid (Orf2) du PCV2 (GenBank accession no. AF201311) génèrent un amplicon de 101 pb. Les séquences de la sonde et des primers sont synthétisées dans le tableau 1.

Tableau 1 - Séquences de la sonde TaqMan PCV2 et des amorces correspondantes.

Sonde TaqMan FAM-MGB/NFQ	5'-ACCTTAACCTTCTATTCTG-3'
Amorce sens	5'-GGGAGCAGGGCCAGAATT-3'
Amorce anti-sens	5'CGCTCTGTGCCCTTGAATACT-3'

1.2. Principe et conditions de la PCR TaqMan PCV2

La sonde TaqMan PCV2 est constituée d'un marqueur « reporter » de type FAM en 5' (6-carboxyfluorescein) et d'un marqueur « quencher » de type NFQ en 3' (Non Fluorescent Quencher), rendant la molécule non fluorescente. Durant l'amplification, l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase dégrade la sonde fixée sur la séquence cible, séparant les deux marqueurs et permettant la fluorescence du « reporter ». A chaque cycle, une molécule de FAM est ainsi libérée et la quantité de fluorescence de FAM, proportionnelle au nombre de copies de l'amplicon, est mesurée en temps réel. La fluorescence émise est normalisée par rapport à une fluorescence interne passive (ROX) à laquelle est soustraite la fluorescence émise pendant les premiers cycles (DeltaRn). Un cycle seuil (Ct) est alors défini, valeur prédictive de la quantité d'amplicons. Il correspond au point d'intersection du seuil de détection fixé au milieu de la phase linéaire de la courbe d'amplification.

Les conditions de PCR ont été pré-optimisées avec « l'Universal Master Mix » (UMM2X-Applied Biosystem). La réaction PCR s'effectue sous un volume de 25 µl, comprenant 1X d'UMM2X, 100nM de chaque amorce, 200nM de la sonde et 5 µl d'ADN à tester (en duplicata). Les conditions de PCR sont : 2 min à 50°C (action de l'UNG, permettant de dégrader les amplicons générés lors des PCRs précédentes), 10 min à 95°C (activation de l'AmpliTaQ Gold polymérase et dégradation de l'UNG), suivi de 40 cycles (dénaturation, 15 sec à 95°C et hybridation/élongation, 1 mn à 60°C). L'amplification et la détection sont réalisées par l'appareil ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystem).

1.3. Préparation de la gamme standard

Le plasmide pPCV2 (4,74 kb), obtenu après le clonage du génome du PCV2 (GenBank no. AF201311) dans un vecteur pPCR-Script SK (Stratagene) (MAHÉ et al. 2000), a été utilisé afin d'obtenir une courbe standard pour la quantification du génome PCV2. Suivant la concentration du plasmide (170ng/µl) et son poids moléculaire ($3,3 \times 10^6$ g/mol), le nombre de copies a été déterminé à $3,3 \times 10^{10}$ copies /µl. Pour la gamme standard, une série de dilutions de 10^8 copies à 10 copies en Tris-Edta a été préparée. Pour chaque essai de PCR, une courbe standard est réalisée. De plus, un contrôle interne est systématiquement ajouté (TaqMan IPC VIC Dye, Applied Biosystem), afin d'éliminer toute réaction faussement négative. Quatre témoins NTC (Non Template Control) sont aussi inclus, l'extrait d'ADN à tester étant remplacé par de l'eau pure (ppi).

1.4. Evaluation de la méthode TaqMan PCV2 sur des échantillons de tissus

Différents échantillons ont été utilisés afin d'évaluer cette méthode.

Les uns sont issus d'une étude expérimentale sur porcelets EOPS de 7 semaines d'âge. Un premier lot de 8 porcelets (lot contrôle challenge CC1) a été suivi pendant 5 semaines après infection PCV2 suivant le protocole décrit par ALBINA et al. (2001). Dans le second lot (lot CC2), les porcelets ont fait l'objet d'un abattage précoce à J4, J8, J14 et J17 post infection (pi) (2 porcelets par série). Des prélèvements d'autopsie ont été effectués (amygdales, poumons, iléons, ganglions trachéobronchiques, mésentériques et inguinaux) et l'ADN de chaque échantillon de tissu a été extrait sur colonne Qiagen (Kit Dneasy tissue system) et analysé par la méthode PCV2 TaqMan.

Les autres échantillons (ganglions trachéobronchiques) sont issus du laboratoire d'analyses LDA22 et proviennent de 79 porcs d'élevage. A partir des résultats histopathologiques, deux groupes ont été obtenus, un premier groupe de 37 porcelets sans lésion typique de MAP et un second groupe de 42 porcelets avec des lésions spécifiques de MAP.

2. RÉSULTATS.

2.1. Standardisation de la méthode TaqMan PCV2

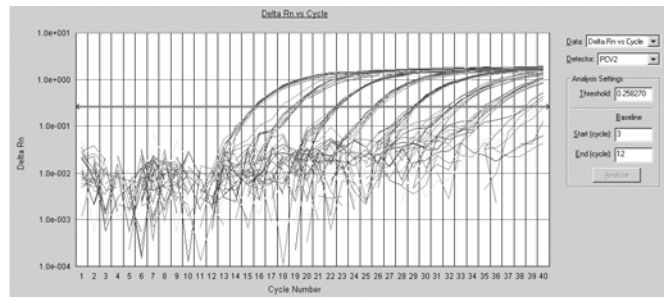
La méthode TaqMan PCV2 a été calibrée par rapport à la gamme étalon réalisée avec différentes dilutions du plasmide standard (10^8 à 10 copies) contenant le génome du PCV2. Les courbes d'amplification obtenues avec la gamme étalon (Log du DeltaRn versus le nombre de cycles) sont représentées en figure 1a. La courbe standard issue de ces résultats montre une relation linéaire existant entre le cycle seuil (Ct) et le nombre de copies du plasmide de 10^8 à 10^1 (figure 1b.). La pente de la courbe est de $-3,319$ (slope), indiquant une excellente efficacité de PCR (100 % pour une pente de $-3,32$). Le coefficient de corrélation (R^2) est supérieur à $0,99$, attestant d'une bonne reproductibilité du pipetage. La sensibilité de la méthode TaqMan PCV2 est proche de 10 copies (80 % de positivité). Aucune amplification n'a été détectée dans les puits NTC.

La reproductibilité intra-essai a été estimée par l'analyse de la gamme étalon répétée dix fois lors de la même PCR (figure 1a). Le coefficient de variation (CV) du cycle seuil se situe entre $0,35$ et $2,35$ % suivant la dilution (tableau 2).

Tableau 2 - Reproductibilité intra et inter-essai de la méthode TaqMan PCV2.

Nombre de copies Plasmide PCV2	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Coefficient de Variation intra-essai (%)	1,47	1,39	1,22	0,35	0,66	0,53	2,35	1,02
Coefficient de Variation inter-essai (%)	1,59	1,35	1,76	1,44	1,02	1,21	1,52	1,41

(1a)



(1b)

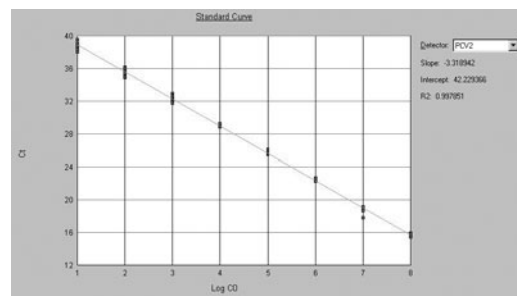


Figure 1 - Représentation graphique de la gamme étalon réalisée avec différentes dilutions du plasmide standard (10^1 à 10^8 copies) contenant le génome du PCV2 : courbes d'amplifications (1a), courbe standard (1b) (reproductibilité intra-essai)

La reproductibilité inter-essai a été évaluée par l'analyse de la gamme étalon sur 11 réalisations de PCR indépendantes. (22 cycles seuil pour chaque dilution). La courbe standard issue de ces résultats (analysée par Microsoft excel) confirme la relation linéaire entre le cycle seuil et le nombre de copies, avec une pente de $-3,287$ et un coefficient de corrélation $> 0,99$ (figure 2). Le coefficient de variation (CV) du cycle seuil se situe entre $1,02$ et $1,76$ % selon la dilution (tableau 2).

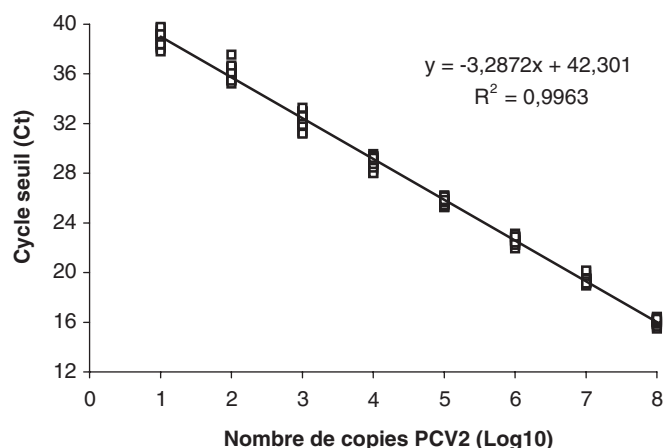


Figure 2 - Courbe standard obtenue lors de la reproductibilité inter-essai (11 réalisations de PCR).

La spécificité de la méthode a été testée avec le plasmide pPCV1, obtenu par clonage du génome PCV1 (GenBank accession no. AF0112107) puis avec de l'ADN génomique de porc isolé à partir de sang total (Novagen) ; dans les

deux cas, aucune amplification n'a été détectée sous contrôle interne.

2.2. Performance de la PCR TaqMan PCV2 sur échantillons de tissus

Lors de notre étude expérimentale sur porcelets, nous avons reproduit une forme atténuée de la pathologie MAP en accord avec le modèle expérimental décrit par ALBINA et al. (2001). Après une période d'incubation (10 à 14 jours), tous les porcs du lot CC1 ont présenté une phase d'hyperthermie $> 40,5^{\circ}\text{C}$ (pendant 1 à 5 jours) ainsi qu'un important retard de croissance essentiellement observé pendant la troisième semaine post infection. L'ADN extrait des tissus des porcs des lots CC1 et CC2 a été soumis à une quantification du génome PCV2.

Les résultats obtenus dans les lots CC1 (J35pi) et CC2 (J4, J8, J14 et J17pi) sont synthétisés dans la figure 3. Au quatrième jour post infection, la moitié des organes (ganglions trachéobronchiques, mésentériques et amygdales) ont présenté un nombre de copies PCV2 de l'ordre de 10^7 par gramme de tissu. A partir du huitième jour post infection, la plupart des organes ont révélé une nette augmentation du nombre de copies PCV2, les amygdales et les ganglions trachéobronchiques présentant le plus fort résultat, 17 jours pi, de l'ordre de 10^{11} copies PCV2 par gramme de tissu. Les résultats observés à J35pi (amygdales et ganglions trachéobronchiques collectés uniquement pour le lot CC1) ont montré une légère diminution du nombre de copies PCV2.

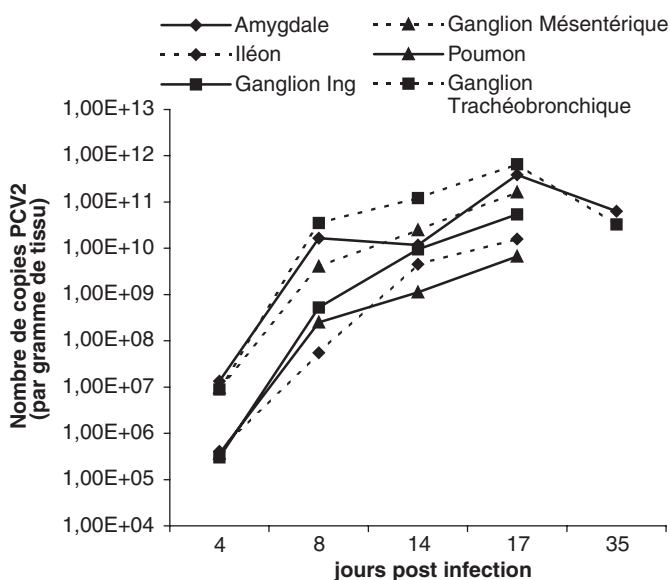


Figure 3 - Évaluation de la charge génomique PCV2 dans les organes de porcs infectés PCV2 (lots CC1 et CC2)

2.3. Corrélation entre diagnostic MAP (par histologie) et nombre de copies PCV2

Sur les 79 porcelets autopsiés au LDA22, 37 ne présentaient pas de lésions spécifiques de MAP (groupe 1) alors que 42 porcelets révélaient des lésions lymphoïdes typiques de MAP (groupe 2). L'ADN extrait des ganglions trachéobronchiques des 79 porcelets a été soumis à une quantification

du génome PCV2. Dans le groupe 1, les résultats, présentés en figure 4, ont montré un nombre de copies PCV2 compris entre 0 et $6,1 \times 10^{11}$ par gramme de tissu, avec une fréquence maximum à 10^7 copies. Dans le groupe 2, les résultats étaient compris entre $2,9 \times 10^9$ et $9,1 \times 10^{13}$ copies de PCV2 par gramme de tissu, avec une fréquence maximum à 10^{12} copies (figure 4). L'analyse statistique des résultats en nombre de copies a montré une différence très significative entre les 2 groupes ($p=0,003$). Comparée aux observations histopathologiques (absence ou présence de lésions MAP), la méthode TaqMan PCV2 a montré une sensibilité et une spécificité, respectivement, de 93 et 86 % pour une valeur de 10^{11} copies de PCV2, et de 69 et 100 % pour une valeur de 10^{12} copies de PCV2. Ces résultats permettent d'estimer une valeur prédictive de la MAP à partir de 10^{11} copies de PCV2 par gramme de tissu.

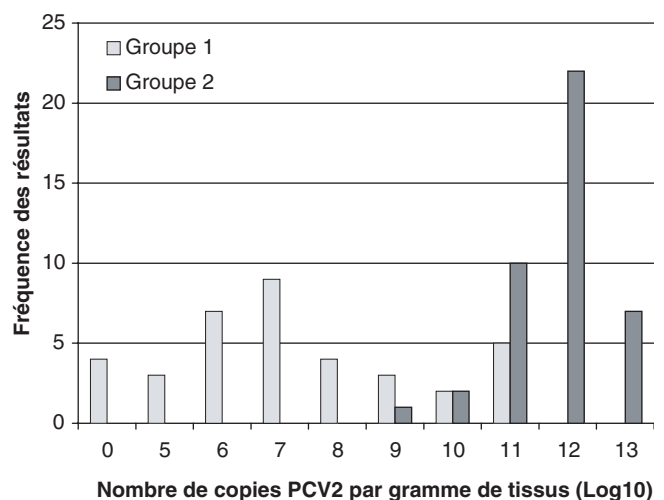


Figure 4 - Fréquence des résultats obtenus en nombre de copies PCV2 dans le groupe 1 (absence de lésions MAP) et dans le groupe 2 (présence de lésions MAP)

3. CONCLUSION

La maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) demeure à l'heure actuelle un problème majeur dans la plupart des principaux bassins de production porcine (SEGALES et al., 2002). Bien que la présence du PCV2 ait été mise en évidence dans des tissus de porcs sains, une forte corrélation a été observée entre la charge génomique PCV2 et la sévérité de l'expression MAP (MEEHAN et al., 2001). Dans cette étude, nous avons développé une méthode PCR TaqMan en temps réel, afin de pouvoir quantifier la charge génomique PCV2 dans les tissus de porcs infectés PCV2.

Basée sur la technologie TaqMan, utilisant une sonde fluorescente de type FAM-NFQ/MGB et un couple d'amorces localisés dans le gène de la capsid virale du PCV2, la méthode TaqMan PCV2 a présenté une sensibilité proche de 10 copies. La courbe standard, obtenue à partir du génome du PCV2, a présenté une linéarité sur 7 logs d'amplitude. De plus, les résultats inter et intra-essais ont démontré une excellente reproductibilité de la méthode. Complétée avec les résultats de spécificité notamment au regard du PCV1 et avec l'apport du contrôle interne prévenant toute réaction

faussement négative, cette méthode TaqMan PCV2 apparaît donc comme une technique fiable pour la quantification du PCV2.

La performance de cette méthode a été évaluée sur des échantillons de tissu provenant de porcs infectés PCV2. Les résultats obtenus lors de l'étude expérimentale ont montré une augmentation significative et régulière du nombre de copies PCV2 dans les organes collectés à J4, J8, J14 et J17 post infection (jusqu'à 10^{12} copies par gramme de tissu). Des résultats similaires ont été obtenus par MEEHAN et al. (2001) sur porcelets immunostimulés et infectés PCV2 présentant une expression sévère de MAP et une charge génomique PCV2 de l'ordre de 10^{12} copies par gramme (ganglions lymphoïdes). Nos résultats obtenus à J17 post infection comparés à nos observations cliniques durant la troisième semaine (hyperthermie et retard de croissance) concordent ainsi avec les observations de LIU et al. (2000), suggérant que l'expression de la MAP requiert une forte charge génomique du PCV2.

Afin d'évaluer la corrélation entre la charge génomique PCV2 et l'expression de la pathologie MAP suggérés par notre étude expérimentale et par des travaux précédents (MEEHAN et al., 2001 ; SIBILA et al., 2003), nous avons recherché à corréler les lésions histopathologiques observées chez les porcelets d'élevage avec la charge génomique PCV2. Deux groupes ont été étudiés ; un premier (37 porcs) sans observation de lésions MAP et un second (42 porcs) présentant des lésions typiques de MAP (lésions lymphoïdes).

Les charges génomiques PCV2 observées dans le second groupe se sont révélées significativement plus élevées que celles observées dans le premier groupe ($p=0,003$). Les résultats du second groupe ont présenté un nombre de copies PCV2 supérieur à 5×10^{10} (excepté un résultat à 3×10^9 copies) avec une fréquence maximum observée à 10^{12} copies alors que les résultats du premier groupe ont montré une majorité de valeurs (84 %) inférieure à 5×10^{10} copies PCV2, avec une fréquence maximum de l'ordre de 10^7 copies. Ces résultats sont tout à fait concordants avec ceux obtenus lors de notre étude expérimentale et ceux de MEEHAN et al., (2001) révélant un nombre de copies de l'ordre de 10^{12} en relation avec l'expression de la pathologie MAP. Du fait de la spécificité et de la sensibilité de la méthode TaqMan PCV2 comparées aux observations histopathologiques dans notre étude de terrain (absence ou présence de lésions), il apparaît qu'une valeur prédictive de la MAP puisse être estimée à 10^{11} copies de PCV2 par gramme de tissu. Cette méthode se positionne donc comme un outil fiable et utile afin de diagnostiquer et de confirmer la pathologie MAP sur des tissus de porcs.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés grâce à la participation financière du FEDER (Fonds Européens de Développement et de Restructuration), du Comité Régional Porcin, de la Région Bretagne et de l'Union Européenne. Les auteurs remercient Bernard BEAUREPAIRE, André KERANFLEC'H, Gérard BENEVENT et Régis VINET pour leur collaboration technique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBINA E., TRUONG C., HUTET E., BLANCHARD P., CARIOLET R., L'HOSPITALIER R., MAHE D., ALLEE C., MORVAN H., AMENNA N., LE DIMNA M., MADEC F., JESTIN A., 2001. *J. Comp. Pathol.*, 125(4), 292-303.
- ALLAN G.M., MEEHAN B., TODD D., KENNEDY S., MCNEILLY F., ELLIS J., CLARK E.G., HARDING J., ESPUNA E., BOTNER A., CHARREYRE C., 1998. *Vet. Rec.*, 142, 467-468.
- ARGAW T., RITZHAUPT A., WILSON C.A., 2002. *J. Virol. Methods*, 106(1), 97-106.
- BALASCH M., SEGALES J., ROSELL C., DOMINGO M., MANKERTZ A., URNIZA A., PLANA-DURAN J. 1999. *J. Comp. Pathol.*, 121, 139-148.
- ELLIS J., KRAKOWKA S., LAIRMORE M., HAINES D., BRATANICH A., CLARK E., ALLAN G., KONOBY C., HASSARD L., MEEHAN B., MARTIN K., HARDING J., KENNEDY S., MCNEILLY F., 1999. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 3-14.
- HAMEL A.L., LIN L.L., NAYAR G.P., 1998. *J. Virol.*, 72, 5262-5267.
- HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M., 1996. *Genome Res.*, 6(10), 986-994.
- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., GELFAND D.H., 1991. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(16), 7276-7280.
- KUTYAVIN I.V., AFONINA I.A., MILLS A., GORN V.V., LUKHTANOV E.A., BELOUSOV E.S., SINGER M.J., WALBURGER D.K., LOKHOV, S.G., GALL A.A., DEMPCY R., REED M.W., MEYER R.B., HEDGPETH J., 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28(2), 655-661.
- LADEKJAER-MIKKELSEN A.S., STADEJEK T., STORGAARD T., NIELSEN J., ALLAN G., BOTNER A., 2001. *Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates*. Saint-Malo, France, 101.
- LAROCHELLE R., MAGAR R., D'ALLAIRE S., 2003. *Can. J. Vet. Res.*, 67(2), 114-120.
- LIU Q., WANG L., WILLSON P., BABIUK L.A., 2000. *J. Clin. Microbiology*, 38(9), 3474-3477.
- LIVAK K.J., FLOOD S.J., MARMARO J., GIUSTI W., DEETZ K. 1995. *PCR Methods Appl.*, 4(6), 357-362.
- MADEC F., EVENO E., MORVAN P., HAMON L., ALBINA E., TRUONG C., HUTET E., CARIOLET R., JESTIN A., 1999. *Journées Recherche Porcine*, 31, 347-354.
- MAHE D., BLANCHARD P., TRUONG C., ARNAULD C., LE CANN P., CARIOLET R., MADEC F., ALBINA E., JESTIN A., 2000. *J. Gen. Virol.*, 81, 1815-1824.
- MARKOWSKI-GRIMSRUD C.J., MILLER, M.M. and SCHAT K.A., 2002. *J. Virol. Methods.*, 101(1-2), 135-147.
- MEEHAN B.M., MCNEILLY F., TODD D., KENNEDY S., JEWHRST V.A., ELLIS J.A., HASSARD L.E., CLARK E.G., HAINES D.M., ALLAN G.M., 1998. *J. Gen. Virol.*, 79, 2171-2179.

- MEEHAN B.M., GILPIN D.F., KRAKOWKA S., ELLIS J.A., MCNEILLY F., ALLAN G.M., 2001. Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. Saint-Malo, France, 103.
- MOEN E.M., SLEBODA J., GRINDE B., 2002. *J. Virol. Methods* 104(1), 59-67.
- MOROZOV I., SIRINARUMITR T., SORDEN S.D., HALBUR P.G., MORGAN M.K., YOON K.J., PAUL P.S., 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2535-2541.
- QUINTANA J., SEGALES J., ROSELL C., CALSAMIGLIA M., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., CHIANINI F., FOLCH J.M., MALDONADO J., CANAL M., PLANA-DURAN J., DOMINGO M., 2001. *Vet. Rec* 149(12), 357-361.
- ROVIRA A., BALASCH M., SEGALES J., GARCIA L., PLANA-DURAN J., ROSELL C., ELLERBROK H., MANKERTZ A., DOMINGO M. 2002. *J. Virol.*, 76(7), 3232-3239.
- SEGALES J., DOMINGO M., 2002. *Vet Q*, 24(3), 109-124.
- SIBILA M., OLVERA A., CALSAMIGLIA M., SEGALES, J. and DOMINGO M. 2003. Proceedings for the 4th International Symposium on emerging and re-emerging pig diseases. Rome, Italy, 207-208.