

La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP)

2 - Études expérimentales, virologiques et sérologiques

Catherine TRUONG (1), P. LE CANN (2), Ph. BLANCHARD (2), Évelyne HUTET (1),
E. ALBINA (1), A. JESTIN (2), R. CARIOLET (3), F. MADEC (4)

C.N.E.V.A. - Zoopôle les Croix, BP53, 22440 Ploufragan

(1) Unité de Virologie & Immunologie Porcines

(2) Service de Biologie Moléculaire

(3) Service de Production de Porcs Assainis & Expérimentation

(4) Unité Epidémiologie Porcine & Assurance Qualité

La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) : 2 - Études expérimentales, virologiques et sérologiques

Apparue en 1995 à l'Est des Côtes d'Armor et en Ille et Vilaine, la Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) s'étend aujourd'hui à l'ensemble de la Bretagne et de nouveaux cas ont été recensés dans d'autres régions du Grand Ouest Français. Même si l'agent étiologique de cette maladie n'est toujours pas à ce jour identifié de manière indiscutable, de nombreux travaux tendent à montrer que cette pathologie est étroitement liée à la présence d'un agent infectieux viral : le Circovirus de type II ou Circovirus de type pathogène.

Visualisé en microscopie électronique à partir de prélèvements de tissus de porcs présentant les signes cliniques de la MAP, ce circovirus est désormais détecté par culture cellulaire grâce à la mise au point d'un système de réplication sur cellules PK couplé à une technique IPMA. Le séquençage génomique après clonage par PCR du circovirus isolé à partir de tissus lésés révèle une homologie nucléotidique de 70% avec le Circovirus de type non pathogène contaminant naturel de la lignée cellulaire PK15-CCL33. De ces études de virologie moléculaire ont été générées des protéines circovirales recombinantes actuellement en cours d'évaluation dans le cadre du développement d'un test de diagnostic sérologique ELISA. En parallèle, une approche de cartographie épitopique sur peptides de synthèse est également envisagée dans le cadre du développement d'un test de diagnostic sérologique différentiel Circovirus pathogène - Circovirus non pathogène.

Piglet Wasting Disease (PWD) : 2 - Porcine Experimentations, Virological Studies and Serologic Assays

Since its first occurrence in 1995 in the East of Côtes d'Armor and Ille et Vilaine (Brittany), Piglet Wasting Disease (PWD) is now largely widespread all around Brittany. Similar clinical pathology have also been recently diagnosed in farrow-to-finish farms outside Brittany. Several reports strongly suggest an aetiological association of the porcine circovirus strain II (also called pathogenic circovirus strain) with PWD.

Electromicroscopic investigations of the lymph nodes of affected piglets revealed numerous small virion-like particles. Circovirus isolation from porcine tissues was performed with a cellular system using an immunohistochemical staining (IPMA). Circovirus DNA extracted from tissues lesions has been cloned and sequenced. The DNA sequence of this PWD-associated circovirus has 70% homology with that of a previously published nonpathogenic strain which is a natural inhabitant of PK15-CCL33 cells. Recombinant circoviral proteins have been expressed using baculovirus-insect cell system to be evaluated as a serodiagnostic antigen. Further experiments are underway to investigate the development of a type-specific serodiagnostic assay using synthetic peptides in epitope mapping studies.

INTRODUCTION

Apparue en 1995 à l'Est des Côtes d'Armor et en Ille et Vilaine, la Maladie de l' Amaigrissement du Porcelet (MAP) s'étend aujourd'hui à l'ensemble de la Bretagne et de nouveaux cas ont été recensés dans d'autres régions du Grand Ouest français. Cliniquement caractérisée par le dépérissement des animaux (hyperthermie, pâleur, ralentissement de la croissance) et dans son expression la plus sévère par un taux de mortalité avoisinant 20% (fonte musculaire, atteintes cardiaque et respiratoire), l'agent étiologique de cette maladie n'est toujours pas à ce jour authentifié de manière indiscutable. Cependant, suite aux nombreux travaux menés tant en France qu'aux Canada, Etats-Unis, Irlande et Espagne (LE CANN et al, 1997, ELLIS J. et al, 1998; HARDING, 1997; DAFT et al, 1996; ALLAN et al, 1998; SEGALÉS et al, 1997), cette pathologie semble étroitement liée à la présence d'un agent infectieux viral : le Circovirus de type II. Affilié à la famille des *Circoviridae* au même titre que le Virus de l'Anémie Infectieuse du poulet et le Virus du Dépérissement des Psittacides en raison de ses caractéristiques génomiques (ADN simple brin circulaire de petite taille) et de la pathologie qu'il provoque (immunosuppression, amaigrissement, dépérissement), ce circovirus porcine de type II est apparenté avec un degré d'homologie nucléotidique de 70% à un autre circovirus porcine, le circovirus de type I, dont il diffère néanmoins radicalement en terme de pathogénicité (HAMEL et al, 1998, MOROZOV et al, 1998). Identifié dès 1982 comme contaminant viral non cytopathique d'une lignée continue de cellules de rein de porc PK15-CCL33 (TISCHER et al, 1982), aucune pathologie n'a jamais pu être associée à ce virus en dépit d'une forte prévalence naturelle en anticorps au sein de différentes populations porcines et des séroconversions observées en réponse à une infection expérimentale (TISCHER et al, 1986; DULAC et al, 1989; HINES et al, 1995). Cette publication se propose de décrire l'histoire des travaux menés au CNEVA Ploufragan sur le Circovirus de type II ou Circovirus de type pathogène depuis son isolement à partir de tissus de porcs d'élevage présentant des signes cliniques de MAP jusqu'au développement d'un modèle expérimental reproductible et d'un test de diagnostic sérologique différentiel.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Études virologiques

Suite à la description en élevage de manifestations pathologiques inhabituelles telles que du dépérissement associé ou non à des complications digestives et/ou respiratoires, des porcelets suspects sont transférés dans les installations expérimentales protégées du CNEVA. L'évolution naturelle de la pathologie chez certains d'entre eux nécessite une euthanasie.

1.1.1. Isolement et détection virale

L'autopsie des porcelets euthanasiés révèle une hypertrophie généralisée des ganglions périphériques ainsi que des lésions pulmonaires. Un broyat de ces ganglions observé en

microscopie électronique permet la visualisation de particules sphériques d'environ 17nm de diamètre morphologiquement semblables aux particules circovirales de type non pathogène contaminant la lignée PK15-CCL33.

L'inoculation des broyats filtrés sur culture de cellules de rein de porc PK15 permet d'isoler cet agent viral. Détecté intracellulairement par une réaction antigène-anticorps (technique Immuno-Peroxydase Monolayer Assay) dont les principales étapes sont rappelées dans le tableau 1, ce virus apparaît comme non cytopathique et faiblement répliquatif.

1.1.2. Études moléculaires

Amplifié par PCR à partir des broyats tissulaires à l'aide d'un couple d'amorces judicieusement choisies, le génôme de ce virus est alors cloné. Le séquençage des 1700 nucléotides révèle une homologie de 70% avec le circovirus de type I ainsi que plusieurs ORFs codant potentiellement pour des protéines. Seul le rôle fonctionnel de l'ORF1 est connu avec certitude. C'est la protéine de répllication du circovirus (MANKERTZ et al, 1997).

L'expression en système baculovirus-cellules d'insecte des ORFs 1, 2 et 3 des circovirus de type pathogène et non pathogène permet pour certains d'entre eux de générer des protéines recombinantes.

L'immunisation de souris avec l'un de ces vecteurs baculoviraux permet la génération d'un antiserum spécifique de la protéine de répllication du circovirus de type non pathogène actuellement utilisé dans le test de détection immunocytochimique du circovirus décrit au paragraphe 1.1.1.

1.1.3. Essais d'amplification en culture cellulaire

Préalablement observé avec le circovirus de type non pathogène, le faible taux de répllication de ce virus est sensiblement accru par un traitement à la d-glucosamine en solution dans des sels de Earle (TISCHER et al, 1987). Le système de répllication in vitro développé sur cellules de rein de porc PK15 consiste à incuber la monocouche de cellules infectée 4h auparavant avec la solution de d-Glucosamine pendant 60 min à 37°C. Trente-six heures plus tard, la production de virus intracellulaire est mise en évidence par la technique IPMA décrite au paragraphe 1.1.1. et modifiée au paragraphe 1.1.2. Le pourcentage de cellules infectées est alors estimé par dénombrement des cellules colorées en rouge. Appliqué à l'inoculation de dilutions successives de broyats filtrés, ce système permet le titrage du circovirus.

Afin d'améliorer le rendement du système de répllication sur cellules PK, l'effet de la surinfection d'une culture cellulaire soit par l'inoculum initial soit par un lysat de cellules infectées a été évalué.

1.2. Reproduction expérimentale de la maladie

Toute étude sur une nouvelle pathologie doit pouvoir s'appuyer sur un modèle expérimental permettant d'aborder la description de la maladie et de ses mécanismes pathogéniques, l'identification de l'étiologie et la mise au point de traitements ou de moyens de prévention tels que les vaccins.

1.2.1. Description des essais

Dans le cas de la MAP, pas moins de 8 essais expérimentaux ont été nécessaires pour appréhender puis maîtriser le modèle expérimental (tableau 2).

1.2.2. Suivi des essais et données physiologiques

Les animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et/ou conventionnels sont transférés dans les installations expérimentales protégées une semaine avant le début effectif de l'essai.

L'inoculation s'effectue à J0 après prise de sang sur tube sec, prise de température et pesée des animaux.

Sur toute la durée de l'essai, le suivi des animaux s'effectue quotidiennement par une prise de température et hebdomadairement par une prise de sang et une pesée. Toute manifestation inhabituelle, telle que de la diarrhée, une prostration, de la toux, etc..., est également signalée.

À chaque décès d'un animal par mort naturelle ou euthanasie, une autopsie est systématiquement effectuée. En fonction des résultats de l'autopsie des prélèvements de tissus, le plus souvent des ganglions, des poumons et des reins, sont effectués en vue d'analyses histologiques, bactériologiques et/ou virologiques.

1.3. Études sérologiques

En complément de la recherche circovirale sur prélèvement

tissulaire, le développement d'un test de diagnostic sérologique ELISA spécifique du circovirus de type pathogène constitue une étape décisive et prioritaire pour le dépistage en masse des élevages porcins.

1.3.1. Développement d'un test sérologique ELISA antigène entier

Des études moléculaires du circovirus décrites au paragraphe 1.1.2. ont été générées en cellules d'insecte Sf9 les protéines recombinantes ORF1 et ORF2.

Extraites par lyse cellulaire thermique, ces protéines brutes sont adsorbées passivement au fond des puits d'une microplaque puis la réactivité de sérums de porcs d'expérimentation EOPS infectés/non infectés par le circovirus de type pathogène est évaluée par une réaction ELISA indirecte.

Des réactivités non spécifiques ont été observées lors de l'évaluation de ce test. Les mêmes protéines ont donc été partiellement purifiées avant adsorption.

1.3.2. Développement d'un test sérologique ELISA peptide de synthèse

La cartographie épitopique des protéines ORF 1 et ORF 2 des circovirus de type pathogène et non pathogène est actuellement en cours. Basée sur la réactivité de sérums de porcs d'expérimentation (EOPS et conventionnels, infectés et

Tableau 1 - Les différentes étapes de la détection IPMA du Circovirus

Technique IPMA Circovirus	
Inoculation virale sur monocouche cellulaire	
Perméabilisation cellulaire par fixation à l'acétone	
Incubation avec un sérum de porc ayant présenté des signes cliniques de MAP et convalescent	
Incubation avec un anticorps de lapin anti-sérum de porc marqué à la peroxydase	
Révélation colorée par réduction enzymatique du substrat	
Visualisation de cellules rouges = cellules infectées ayant produit du virus et de cellules roses = cellules non infectées	

Tableau 2 - Objectifs et procédure de réalisation des différents essais expérimentaux.

	Objectif	Procédure
Essai 1	Observer l'évolution naturelle de la pathologie Décrire toutes les manifestations cliniques	Transfert de porcelets d'élevage suspects dans les installations expérimentales protégées
Essai 2	Reproduire la maladie sur des porcs EOPS Étude Cinétique	Inoculation de broyats d'organes de porc de l'Essai 1 Abattage à 8, 12 et 16 jours post-infection
Essai 3	Reproduire la maladie sur des porcs EOPS terrain	Inoculation de broyats d'organes de porc de l'Essai 1
Essai 4	Réactiver le circovirus de type non pathogène chez des porcs EOPS	Induction d'une immunodépression par injection de corticoïdes
Essai 5	Reproduire la maladie sur porcs EOPS par: Virus multiplié in vitro sur culture cellulaire ADN viral	Inoculation de : Virus multiplié sur PK15 ADN circoviral Lymphocytes transfectés par ADN circoviral
Essai 6	Constituer un stock de virus sur porcs EOPS	Inoculation de broyats d'organes de porcs de l'Essai 3
Essai 7	Reproduire la maladie en parallèle sur des porcs EOPS et conventionnels	Inoculation de broyats d'organes de porcs de l'Essai 6 de titre viral déterminé
Essai 8	Essai d'immunisation sur porcs conventionnels	

non infectés) vis-à-vis d'un panel de peptides synthétiques couvrant la séquence entière des protéines ORF1 et ORF2 des deux types de circovirus, cette approche devrait théoriquement permettre la discrimination de séquences antigéniques spécifiques de chacun des deux types de circovirus ainsi que le développement d'un test de diagnostic sérologique différentiel.

2. RÉSULTATS

2.1. Études virologiques

2.1.1. Recherche circovirale dans les tissus porcins

Grâce au système de réplication développé sur PK couplé à la technique IPMA, du circovirus a pu être détecté au niveau des ganglions, des poumons et des reins. En revanche, aucune virémie n'a jamais pu être mise en évidence.

2.1.2. Amplification circovirale en culture cellulaire

À l'image du circovirus de type non pathogène, la réplication du circovirus de type pathogène est induite par un traitement à la d-Glucosamine. De 1 à 2% de PK infectées par l'inoculation d'un broyat de tissu, on observe après traitement à la d-Glucosamine 30 à 35% de PK infectées. La surinfection virale de ces 30 à 35% de PK infectées augmente également le pourcentage de PK infectées (tableau 3). Le titre circoviral est estimé à 106 TCID₅₀/ml pour certains broyats de tissus.

2.2. Reproduction expérimentale de la maladie

Les essais expérimentaux réalisés dans les installations protégées ont permis de décrire les manifestations cliniques macroscopiques et microscopiques observées en réponse à l'infection expérimentale par le circovirus de type pathogène chez des porcs EOPS ainsi que chez des porcs conventionnels. Caractérisée par une incubation longue de 8 à 14 jours, des hyperthermies franches (>40,3°C) sur 2 à 8 jours, une diminution de la consommation alimentaire et un ralentissement de la croissance pondérale à la 2ème, 3ème ou 4ème semaine post-infection, la MAP est également suspectée en présence d'un tableau lésionnel incluant des hypertrophies ganglionnaires avec déplétion lymphocytaire et des lésions de pneumonie. Le récapitulatif des suivis d'essais de reproduction expérimentale est présenté dans les tableaux 4 et 5.

2.3. Études sérologiques

2.3.1. Test sérologique ELISA antigène entier

Le développement d'un test de détection des anticorps anti-circovirus de type pathogène basé sur les protéines recombinantes ORF1 et ORF2 exprimées en cellules d'insecte Sf9 requiert la purification partielle de ces antigènes. En effet, une fixation non spécifique des anticorps sériques porcins sur les protéines cellulaires Sf9 est observée lors de l'évaluation antigénique de lysats Sf9 exprimant ORF1 et ORF2 (tableau 6). Cette fixation non spécifique est considérablement réduite par la semi-purification de ces protéines comme l'indiquent également les valeurs du tableau 6 (p. 358). L'ORF 2 y apparaît également comme un bon candidat au développement d'un test sérologique.

2.3.2. Test sérologique ELISA peptide de synthèse

Les résultats préliminaires de la cartographie épitopique des protéines ORF1 et ORF2 des Circovirus de type pathogène et non pathogène à l'aide de sérums de porcs EOPS inoculés par le Circovirus de type pathogène nous ont permis d'identifier les épitopes viraux ORF1 et ORF2 immunogènes et les épitopes ORF2 discriminant le Circovirus de type pathogène et le Circovirus de type non pathogène (résultats non montrés).

CONCLUSION

La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) et le Circovirus qui y est associé ont fait l'objet de nombreuses descriptions cliniques et expérimentales en Europe et Outre-Atlantique. Les observations expérimentales rapportées ici sont relativement concordantes avec la plupart de ces descriptions en particulier en ce qui concerne:

- les manifestations pathologiques cliniques et lésionnelles observées en élevage à savoir de l'hyperthermie, une diminution de la consommation alimentaire et un ralentissement de la croissance pondérale associés dans certains cas à des hypertrophies ganglionnaires et des lésions de pneumonie
- le procédé d'isolement viral à partir de tissus porcins lésés par inoculation d'un broyat ultrafiltré sur monocouche de cellules PK puis induction de la réplication virale par traitement à la d-Glucosamine
- la technique de détection virale par immunocytochimie basée sur l'utilisation soit d'un antiserum de porc convalescent soit d'un antiserum de souris immunisée avec une protéine circovirale recombinante

Tableau 3 - Effet de la surinfection sur la réplication circovirale.

Inoculation	PK infectées au 1er passage %	PK infectées au 2ème passage %
Broyat de tissu	30 à 35	-
Surinfection par broyat de tissu	-	42 à 47
Surinfection par lysat de PK infectées	-	37 à 42

Tableau 4 - Récapitulatif des différents essais de reproduction expérimentale.

Essai	1	2	3	6	7	7	8
Objectif	Décrire manifestations cliniques	Reproduire MAP sur EOPS	Reproduire MAP sur EOPS terrain	Produire stock Circovirus pathogène	Déterminer titre viral reproduisant MAP	Déterminer titre viral reproduisant MAP	Essai d'immunisation
Statut animal	Conventionnels	EOPS CNEVA	EOPS Terrain	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	Conventionnels	Conventionnels
Âge à l'infection	10 semaines	9 semaines	6 semaines	5 semaines	5 semaines	5 semaines	6-7 semaines
Début des hyperthermies	-	10 jours PI	9 à 13 jours PI	12 à 13 jours PI	9 à 14 jours PI	8 à 12 jours PI	12 jours PI
Porcs en hyperthermie	-	100%	83%	92%	100%	75%	88%
Jours d'hyperthermie par porc	nd	7	4,5	3,3	5,8	7,5	11,6
Températures maximales	41°C 41,7°C	40,4 à 42,3°C	40,6 à 41,6°C	40,2 à 40,8°C	40,3 à 42°C	40,6 à 41,9°C	40,2 à
Porcs en hyperthermie/sem. (%)							
S1	nd	3,5 (3,5)	17 (36)	7 (5)	37 (17)	16 (17)	20 (28)
S2	nd	42 (3,5)	7 (13)	13 (1)	21 (3)	52 (10)	37 (28)
S3	nd	35 (3,5)	33 (10)	28 (7)	62 (2)	34 (12)	79 (17)
S4		21 (3,5)	28 (7)	5 (0)	6 (3)	25 (22)	55 (3)
G. M. Q. (g)							
S1	nd	928 (1053)	417 (357)	564 (520)	650 (589)	401 (407)	509 (512)
S2	nd	678 (1028)	428 (617)	503 (718)	612 (584)	294 (514)	410 (310)
S3	nd	661 (1000)	771 (642)	381 (657)	520 (851)	375 (386)	435 (440)
S4	nd	786 (1100)	550 (657)	764 (778)	641 (696)	473 (610)	451 (681)
Transmission par contact	nd	100%	75%	nd	nd	nd	nd
Lésions pulmonaires %	nd	25	75	0	25	25	en cours
Lésions ganglionnaires %	nd	17	33	67	25	50	en cours
Intérêt de l'essai	Isolement	Reproduction avec détection de circovirus dans tissus	Reproduction avec détection de circovirus dans tissus	Production de 4,5l d'inoculum à 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Détermination du titre viral reproduisant la MAP	Détermination du titre viral reproduisant la MAP	Protection contre l'épreuve

Les valeurs entre parenthèses caractérisent les animaux témoins et les valeurs **en gras** indiquent une différence entre animaux infectés et animaux témoins.

PI = Post-Inoculation

nd = non déterminé

Tableau 5 - Résultats des essais expérimentaux 4 & 5.

Essai	4	5
Objectif	Réactivation Circovirus non pathogène	Reproduire MAP avec ADN viral & lymphocytes transfectés
Résultat	Aucune Réactivation du Circovirus non pathogène Détection virale - Séroconversion -	Aucune Reproduction MAP Séroconversion + Réplication ADN viral in vivo -

Tableau 6 - Densités optiques mesurées au spectrophotomètre à 490nm lors de la réaction immuno-chimique entre les antigènes de divers extraits cellulaires bruts et les anticorps de sérums porcins provenant d'animaux EOPS infectés et non infectés par le Circovirus.

Antigène adsorbé en microplaque	Réactivité Sérums Porcs EOPS non inoculé par Circovirus	Réactivité Sérums Porcs EOPS inoculé par Circovirus
Lysat Brut Sf9	0,166	0,339
Lysat Brut Sf9 exprimant ORF1	0,145	0,251
Lysat Brut Sf9 exprimant ORF2	nd	nd
Sf9 semi-purifié	0,076	0,088
Sf9 exprimant ORF1 semi-purifié	0,09	0,1
Sf9 exprimant ORF2 semi-purifié	0,071	1,035

nd = non déterminé.

- les types de tissus infectés
- les données de virologie moléculaire et principalement de séquençage génomique avec la mise en évidence d'une homologie nucléotidique de 70% avec le Circovirus de type non pathogène
- le taux de réplication virale naturellement faible et son accroissement par le biais d'une surinfection

En revanche, les essais expérimentaux réalisés dans nos installations expérimentales protégées ont permis de reproduire une pathologie MAP fruste sur porcs EOPS et une pathologie MAP typique sur porcs conventionnels avec présentation d'une symptomatologie aiguë spectaculaire et irrémédiable similaire à celle observée dans certains élevages à savoir blancheur de l'animal, flancs creux, tremblement et vacillement corporels, respiration saccadée. Des analyses bactériologiques réalisées après autopsie ont montré l'émergence d'une flore bactérienne opportuniste incluant *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Staphylocoque* et *Streptocoque*. La MAP est ainsi fortement suspectée d'être une immunopathologie cliniquement exprimée à des degrés variables dans le cadre d'une immunosuppression virale. Cette hypothèse semble d'ailleurs confortée par l'observation de déplétions lymphocytaires ganglionnaires.

Un essai expérimental d'immunisation contre le circovirus de type pathogène a fourni des résultats intéressants. Il est possible d'induire une protection clinique dans le modèle expé-

mental, montrant ainsi le rôle du circovirus II comme agent primaire de la MAP. Des travaux complémentaires sont en cours, en particulier en terme de recherche d'épitope viral protecteur, d'analyse sérologique humorale et cellulaire, de neutralisation virale *in vitro* et de reproductibilité expérimentale sur des porcs EOPS et des porcs conventionnels.

Aucune donnée concernant une éventuelle étude de sérodiagnostic ELISA circovirus n'a été publiée à ce jour. En dépit d'un besoin urgent de dépistage des élevages porcins, la mise à disposition d'un test sérologique spécifique du Circovirus de type pathogène est sensiblement retardée en raison de la circulation hypothétique du Circovirus de type non pathogène ainsi que de l'existence démontrée de réactivités sérologiques croisées entre ces deux virus. Les études de cartographie épitopique devraient nous permettre d'aboutir rapidement à la mise au point d'un test de diagnostic sérologique différentiel.

REMERCIEMENTS

Ces travaux n'auraient pu être réalisés sans la contribution financière décisive de partenaires : Région Bretagne et Comité Régional Porcin. Nos remerciements vont également à tout le personnel du CNEVA Ploufragan ayant contribué à la mise au point du modèle expérimental, en particulier A. KERANFLEC'H, G. BENNEVENT et J.P. JOLY.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLAN G.M., Mc NEILLY F., KENNEDY S., DAFT B., CLARKE E.G. et al., 1998, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 3-10.
- DAFT B., NORDHAUSEN R., LATIMER K., NIAGRO F., 1996. *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. p32
- DULAC G. C., AFSHAR A., 1989. *Can. J. Vet. Res.* 53, 431-433
- ELLIS J., HASSARD L., CLARK E., HARDING J., ALLAN G., et al. 1998. *Can. Vet. J.* 39, 44-51
- HAMEL A., LIN L., NAYAR G.S. 1998., *J. Virol.* 72, 5262-5267
- HARDING J.C., 1997. *Proceedings of the annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*. p 503
- HINES R., LUKERT P., 1995. *Swine Health and Production*. 3, 71-74
- LE CANN P., ALBINA E., MADEC F., CARIOLET R., JESTIN A., 1997. *Vet. Rec.* 141 : 660
- MANKERTZ A., MANKERTZ J., WOLF K., BUHK H. J., 1998. *J. Gen. Vir.* 79, 381-384
- MOROZOV I., SIRINARUMITR T., SORDEN S., HALBUR P., MORGAN M., et al., 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2535-2541
- SEGALÉS J., SITJAR M., DOMINGO M.; DEE S., DEL POZO M., et al., 1997. *Vet. Rec.* 141, 600
- TISCHER I., GELDERBLUM H., VETTERMAN W., KOCH M., 1982. *Nature* 295, 64-66
- TISCHER I., MIELDS W., WOLFF D., VAGT M., GRIEM W., 1986. *Arch. Virol.* 91, 271-276
- TISCHER I., PETERS D., RASCH R., POCIULI S., 1987. *Arch. Virol.*, 96, 39-57