

Etude de l'influence de la virulence des souches de peste porcine classique sur l'immunopathogénicité du virus chez les suidés et sur la propagation de la maladie en zone de forte densité porcine

Sylvie DAVILA, Roland CARIOLET, Marie-Frédérique LE POTIER

avec la collaboration technique de V. ROSE, B. JAN, L. PIRIOU, A. MAHÉ.

AFSSA - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Zoopôle, B.P.53 22440 Ploufragan.

Etude de l'influence de la virulence des souches de peste porcine classique sur l'immunopathogénicité du virus chez les suidés et sur la propagation de la maladie en zone de forte densité porcine

La Peste Porcine Classique (PPC) à l'origine de sévères pertes économiques n'a pas encore pu être totalement éradiquée en Europe. La détection d'un nouveau foyer de PPC est généralement basée sur l'apparition de mortalité, de signes cliniques douteux ou de lésions suspectes lors d'autopsie. Cependant, depuis quelques années, la maladie circule de façon silencieuse notamment dans les populations de sangliers sauvages, les souches virales impliquées n'étant plus aussi virulentes que par le passé. Une étude expérimentale a été conduite afin d'étudier l'influence de la virulence de différentes souches de virus de la PPC sur les réactions cliniques et biologiques de porcs infectés ainsi que sur la propagation de ces souches à des porcs non infectés en contact indirect. Les résultats révèlent que lors d'une infection par une souche moyennement virulente, les symptômes cliniques sont atténués et apparaissent tardivement comparés à une infection par une souche très virulente. De plus, même si les porcs contaminés par une souche moyennement virulente ont plus de chance de récupérer que des animaux infectés par une souche très virulente, le développement d'une immunité est un processus lent et lors de cette mise en place, le virus peut continuer à se propager. Ainsi, une contamination par une souche atténuée accroît les risques épidémiologiques. Ceci souligne le statut de réservoir à virus des animaux infectés par un isolat hypovirulent. La virulence apparaît donc comme un paramètre central de la diffusion de la maladie.

A study of the influence of the degree of virulence of Classical Swine Fever on the immunopathogenicity of the virus in pigs and on its propagation in areas of high pig density

Classical Swine Fever (CSF), which is known to cause severe economic losses, has still not been entirely eradicated in Europe. The detection of a new CSF outbreak is generally based on mortality, doubtful clinical signs or suspicious lesions at autopsy. However, for many years the disease has spread silently, particularly within the wild boar population. The viral strains implicated are not as virulent as before. An experimental study was performed in order to study the influence of the virulence of different strains of CSF on clinical and biological reactions of infected pigs as well as the propagation of the strains in uninfected pigs which come into indirect contact with infected pigs. The results reveal that when infected by a moderately virulent strain, clinical symptoms are attenuated and appear later compared to a highly virulent strain. Furthermore, even if there is a good chance that pigs infected by a moderately virulent strain of CSF will survive compared to pigs infected by a virulent strain, the development of immunity is a slow process, which means that the virus can continue to spread. Therefore, contamination by an attenuated strain increases the epidemiological risks. This highlights the fact that animals infected by a hypo-virulent strain act as a reservoir of infection. The degree of virulence appears to be a central parameter in the spread of the disease.

INTRODUCTION

La PPC est une maladie infectieuse virale qui peut provoquer des dégâts considérables sur l'industrie porcine dans de nombreux pays dont ceux de l'Europe. L'agent causal de cette maladie appartient au genre *Pestivirus* de la famille des *Flaviviridae* et présente des similarités structurales et antigéniques avec le virus de la diarrhée virale bovine (Bovine Viral Diarrhea Virus = BVDV) et le virus de la pestiviriose ovine (Border Disease = BD) (WENGLER et al., 1995). Les signes cliniques de la PPC sont extrêmement variables : hyperthermie, symptômes cutanés, leucopénie, hémorragies... Leurs sévérités dépendent de la virulence des souches incriminées. Les souches de virulence atténuées sont responsables de la dissémination du virus car l'infection peut persister longtemps sans être décelée. Cette diffusion à bas bruit est à l'origine de situations endémiques notamment chez les suidés sauvages et accroît le danger d'une propagation de la maladie dans les zones à forte densité de population de porcs domestiques (WENSVOORT et al., 1985). Il existe peu de méthodes pour évaluer la virulence des souches du virus de la PPC. MITTELHOZER et al., (2000) ont décrit une méthode de quantification clinique basée sur une évaluation *in vivo* du degré de sévérités de différents symptômes. A ce jour, il existe également peu d'informations concernant les facteurs de risque de diffusion. Les seules études expérimentales concernant ce sujet ont été menées par LAEVENS et al (1998) et KLINKENBERG et al., (2002). Ils ont mis en place un modèle de diffusion en vue d'étudier les différents paramètres de diffusion biologique. Une étude expérimentale a donc été conduite afin d'étudier l'influence de la virulence de différentes souches de virus de la PPC sur les réactions cliniques et biologiques de porcs infectés ainsi que sur la propagation de ces souches à des porcs non infectés en contact indirect. Trois souches de virulence différente ont été choisies pour inoculer des porcs physiquement séparés de 30 cm de porcs sains afin d'éviter tout contact direct nez à nez entre les animaux éprouvés et ceux non infectés. L'observation clinique de ces animaux a permis d'évaluer quantitativement les critères décrits par MITTELHOZER et al., (2000) en vue de différencier *in vivo* la virulence des souches utilisées. L'influence de la virulence sur la réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) et cellulaire (production d'IFN γ) a également été analysée.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Dispositif expérimental et animaux utilisés

L'expérimentation s'est déroulée dans les animaleries protégées de l'AFSSA site de Ploufragan. Ces animaleries sont protégées par filtration absolue de l'air à l'entrée et à la sortie. Ces installations sont soumises aux règles de bio-sécurité très strictes dans la circulation du personnel (niveau P3). Les porcs utilisés lors des expérimentations sont exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), issus de la porcherie protégée de l'AFSSA et indemnes de Pestivirus.

1.2. Conduites de l'expérimentation

1.2.1. Souches virales et modalités d'inoculation

Au cours de l'étude expérimentale, au total trois souches du virus de la PPC de virulence différente ont été utilisées pour infecter les porcs EOPS : une souche hypervirulente (souche *Eystrup*), une souche moyennement virulente (souche *Paderborn*) et une souche vaccinale (souche *Thiverval*). Les porcs ont reçu par voie oronasale un titre viral de 10^6 TCID $_{50}$ /ml (2ml/narine).

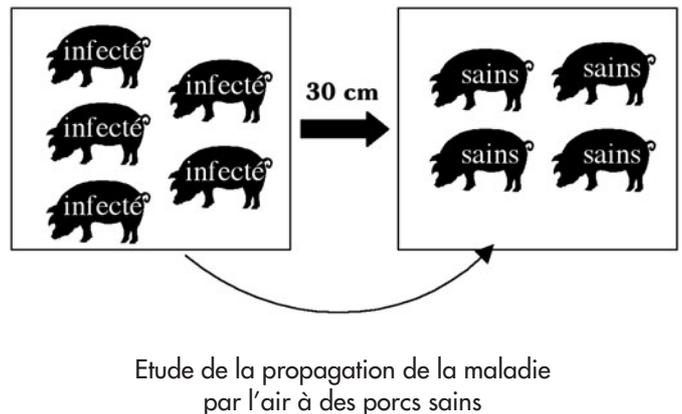


Figure 1 - Modèle de diffusion expérimentale.

1.2.2. Modélisations de diffusion

La répartition des porcs dans les animaleries est décrite dans le tableau 1. La figure 1 représente le modèle de diffusion étudié au cours de l'expérimentation. Les animaux inoculés et contacts sont hébergés dans deux parcs différents distants de 30 cm l'un de l'autre. Les parcs sont à claire-voie et permettent un échange de particules aéroportées entre les animaux des deux parcs sans possibilité de contact direct nez à nez.

Tableau 1 - Répartition des porcs dans les animaleries. Souches virales du virus

Animalerie	Souches virales	Parc1	Parc2
A	Témoins sains	5 sains	
E1	Très virulente (TV) (<i>Eystrup</i>)	5 inoculés	4 contacts
E2	Moyennement virulente (MV) (<i>Paderborn</i>)	5 inoculés	4 contacts
E3	Avirulente (AV) (<i>Thiverval</i>)	5 inoculés	4 contacts

1.2.3. Observations cliniques, prélèvements sur animaux vivants et post mortem

Les porcs font l'objet d'observations cliniques incluant la pesée hebdomadaire, la prise journalière de température

rectale ainsi que l'attribution quotidienne d'un score clinique total selon la méthode décrite par MITTELHOZER et al., (2000). Cette méthode consiste, à partir de neuf critères listés sur le tableau 2, à donner pour chaque paramètre un score allant de 0 à 3. Ces scores sont additionnés afin d'obtenir un score clinique total. Un score clinique total > 15 et une température corporelle > 41°C correspondent à une infection par une souche hypervirulente, un score clinique total compris entre 5 et 15 et une température > 40°C correspondent à une infection par une souche moyennement virulente et un score clinique total < 2 accompagné d'une température > 40°C correspond à une souche faiblement virulente ou avirulente. Des prélèvements sanguins sont réalisés une fois par semaine pour les animaux témoins et trois fois par semaine pour les porcs infectés et contacts indirects. Lors de l'autopsie des porcs euthanasiés la rate, les ganglions rétropharyn-

gés et iléocaecaux, les reins ainsi que les amygdales sont examinés et prélevés.

1.2.4. Tests de laboratoire réalisés sur les échantillons

Lors de l'étude expérimentale le sang prélevé est utilisé afin de réaliser une numération leucocytaire directe automatisée et de récupérer les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) par centrifugation sur gradient de Ficoll. Sur ces cellules, un dosage de la production d'IFN γ par ELISA est réalisé au moyen d'une paire d'anticorps anti-IFN γ fournie par Biosource. Les examens virologiques sont orientés vers la recherche d'ARN viral dans le sang et les organes par la technique de RT-PCR mise au point par MC GOLDRICK et al., (1998). La recherche d'anticorps neutralisants PPC et la recherche de la présence de Pestivirus est entreprise sur les sérums au moyen de la neutralisation virale.

Tableau 2 - Liste de détermination des scores cliniques dans l'expérimentation animale

No	Paramètres	Critères	Score
1	Vivacité/Vigueur	- Attentif, empressé (curieux, se met debout immédiatement) - Vigueur légèrement diminuée (se met debout avec hésitation mais sans aide) - Fatigué, se met debout seulement quand on l'oblige et se recouche - Dormant, ne se mettra pas debout	0 1 2 3
2	Tension du corps	- Relâché, dos droit - Raideur, ankylosé et dos courbé quand il se met debout puis après normal - Le dos courbé et la raideur est maintenue en marchant - Crampes	0 1 2 3
3	Forme du corps	- Estomac/ventre plein, corps « rond » - Ventre creux - Ventre creux, muscles du corps fins - Amaigri, os du dos et côtes visibles	0 1 2 3
4	Respiration (à juger avant d'approcher le cochon)	- Fréquence : 10-15/min, mouvement de poitrine à peine visible - Fréquence : >20/min - Fréquence : >20/min, mouvement de la poitrine net - Fréquence : >30/min, respiration à travers la bouche ouverte	0 1 2 3
5	Démarche	- Mouvements bien coordonnés - Démarche hésitante, le croisement des pattes est corrigé lentement - Ataxie distincte/faiblesse du postérieur, capable de marcher - Très grande faiblesse, incapable de marcher	0 1 2 3
6	Peau (surtout oreille, nez, patte et queue)	- Rose clair uniforme, poil du pelage plat - Parties de peau rouges - Parties de peau violet-décoloré et froide, peu de pétéchies - Décoloration de la peau rouge-noire, pas de sensibilité, grosse hémorragie dans la peau	0 1 2 3
7	Yeux conjonctivite	- Rose clair - Rougi, sécrétion claire - Très enflammé, sécrétion turbide - Très enflammé, sécrétion purulente, vaisseaux sanguins accentués	0 1 2 3
8	Appétit	- Vorace, affamé - Mange doucement quand il est nourri - Ne mange pas quand il est nourri - Ne mange pas du tout, ne montre pas d'intérêt pour la nourriture	0 1 2 3
9	Défécation	- Fèces molles, quantité normale - Quantité réduite de fèces, sec - Seulement quantité faible de fèces et couvertes de fibrine ou diarrhée - Pas de fèces, mucus dans le rectum, diarrhée contenant de l'eau ou ensanglantée	0 1 2 3

2. RÉSULTATS

2.1. Symptômes

Chez les porcs inoculés par la souche *Eystrup*, l'hyperthermie débute dans les 48 heures après l'infection sur deux des cinq animaux et se généralise à l'ensemble de ce groupe au troisième jour. Cette hyperthermie atteint des valeurs $> 41^{\circ}\text{C}$ et perdure jusqu'à leur mort. Le score clinique évolue à compter du quatrième jour post infection pour atteindre cinq jours après un score > 15 (figure 2A). Ces résultats confir-

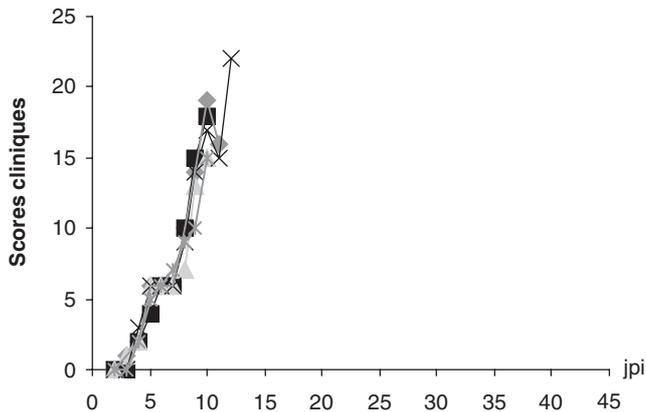


Figure 2A - Evolution des scores cliniques des porcs inoculés par la souche *Eystrup*

ment la forte virulence de la souche utilisée. A ce stade, des pétéchies apparaissent au niveau de l'abdomen évoluant vers des points de nécrose hémorragiques sur les cinq animaux. Une forte cyanose au niveau des oreilles est également notée sur un des porcs. Les autres meurent ou sont abattus dans les 15 jours qui suivent l'inoculation. L'hyperthermie apparaît chez les animaux en contact indirect de ceux inoculés par la souche très virulente à partir du 10^{ème} jour post infection. La figure 2B montre un score cli-

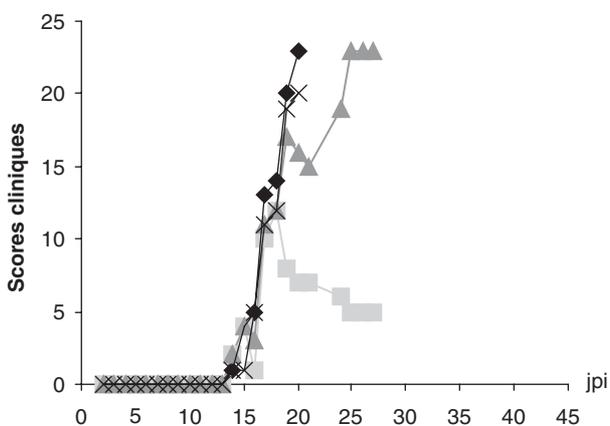


Figure 2B - Evolution des scores cliniques des porcs en contact indirect avec le groupe inoculé par la souche *Eystrup*

nique maximal également > 15 mais les premiers symptômes cliniques apparaissent avec un retard d'environ deux semaines correspondant au délai de contamination. Seul un

porc sur quatre aurait survécu à la maladie. Une hyperthermie généralisée de faible amplitude (Température corporelle comprise entre 40°C et 41°C) affecte les porcs inoculés par la souche *Paderborn* au 5^{ème} jour post infection. Sur la figure 2C, le score clinique maximal représenté est compris entre

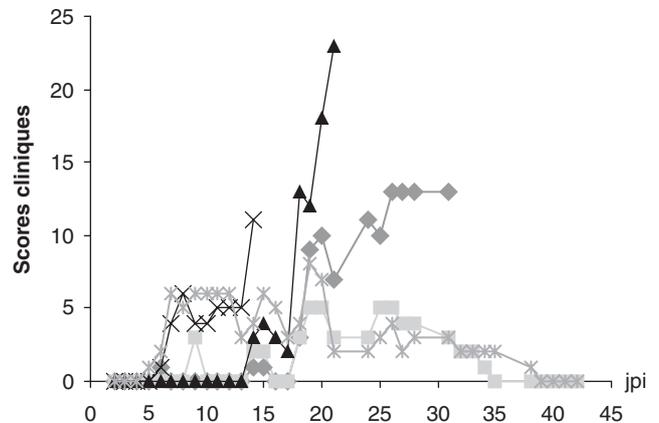


Figure 2C - Evolution des scores cliniques des porcs inoculés par la souche *Paderborn*

5 et 15 chez 3 des 4 animaux inoculés par cette souche, mais pour un des porcs, le score clinique maximal est > 15 . Chez le groupe en contact indirect avec le groupe de porcs inoculés par la souche moyennement virulente, la valeur maximale des scores cliniques corrobore les observations de MITTELHOZER et al., (2001) pour 3 porcs sur 4 (figure 2D).

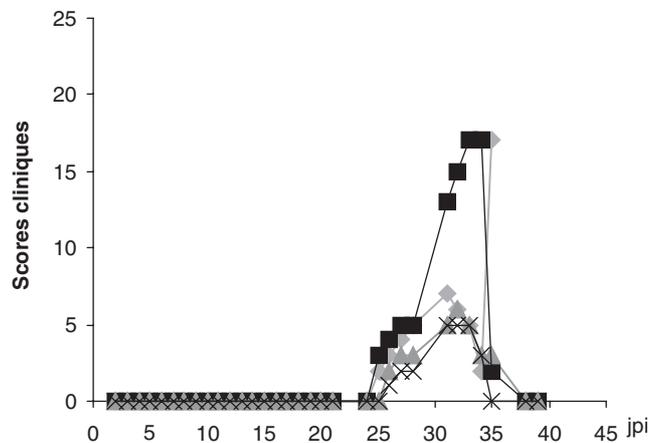


Figure 2D - Evolution des scores cliniques des porcs en contact indirect avec le groupe inoculé par la souche *Paderborn*

Un porc sentinelle possède un score clinique maximal qui dépasse 15. La souche *Paderborn* se comporterait donc chez certains animaux comme une souche très virulente. Les animaux infectés (directement ou indirectement) par la souche *Eystrup* présentent une réponse clinique homogène alors qu'elle est beaucoup plus hétérogène chez les porcs infectés par la souche *Paderborn*. Lors d'une infection par une souche de virulence modérée, le paramètre individuel semble intervenir dans l'apparition et l'intensité des symptômes cliniques. Les porcs qui survivent à l'infection et récupèrent, ont leur score clinique qui diminue pour atteindre une valeur nulle. Les porcs directement infectés par la souche

vaccinale avirulente ainsi que leurs porcs sentinelles n'extériorisent quant à eux aucun symptôme clinique (score clinique nul) pendant toute la durée de l'expérimentation.

2.2. Influence de la virulence sur les risques épidémiologiques

Les résultats de la recherche de l'ARN viral dans le sang par RT-PCR reportés dans le tableau 3 montrent que quelle que soit la virulence de la souche, dès le troisième jour post infection, les porcs inoculés par la souche *Eystrup* ou *Paderborn* contiennent dans leur sang de l'ARN viral du virus de la PPC. Le virus se dissémine donc dans l'organisme puisqu'il est présent dans le sang alors que l'inoculation a été réalisée par voie oro-nasale. Il existe un décalage de la première détection du génome viral chez les sentinelles par rapport aux animaux directement infectés. Ce décalage correspond entre autres au temps de propagation du virus. Les résultats obtenus par RT-PCR pour les animaux éprouvés par la souche vaccinale ou en contact indirect avec ces derniers, n'ont pas été reproductibles donc inexploitable. Ce problème de reproductibilité est certainement dû à une quantité trop faible de virus de la PPC dans le sang. D'après les figures 2b et 2c, chez les animaux en contact indirect avec les porcs inoculés, un décalage entre la première détection d'ARN viral dans le sang et l'apparition des premiers symptômes cliniques est noté. De plus, ce décalage est plus important lorsque la souche *Paderborn* est incriminée. En effet deux des quatre porcs sentinelles de ceux inoculés par la souche très virulente montrent un retard de trois jours dans

l'apparition des premières réactions cliniques par rapport à la première détection du génome viral tandis que tous les porcs sentinelles de ceux inoculés par la souche *Paderborn* révèlent un retard de neuf à cinq jours.

2.3. Identification des sites de réplication du virus de la PPC

La recherche de virus par RT-PCR a été réalisée à partir de 5 organes susceptibles d'héberger le virus de la PPC : les reins, la rate, les amygdales, les ganglions iléocaecaux et les ganglions rétropharyngés (NARITA et al., 2000). Pour les souches *Eystrup* et *Paderborn*, de l'ARN viral a été détecté dans tous les organes prélevés. Pour ces deux types de souches, il semblerait que la distribution spatiale du virus PPC soit la même quelle que soit la virulence. Chez les animaux infectés par la souche vaccinale le schéma de distribution varie un peu. Chez les porcs inoculés par la souche vaccinale, tous les organes contiennent de l'ARN viral sauf la rate. Cette absence de détection de virus dans la rate des porcs vaccinés peut s'expliquer par la trop faible quantité d'ARN viral présent dans ce tissu. Aucun ARN viral n'a été trouvé dans les tissus des porcs sentinelles de cette souche avirulente. Cette absence de virus dans les organes montre la très faible diffusion de cette souche.

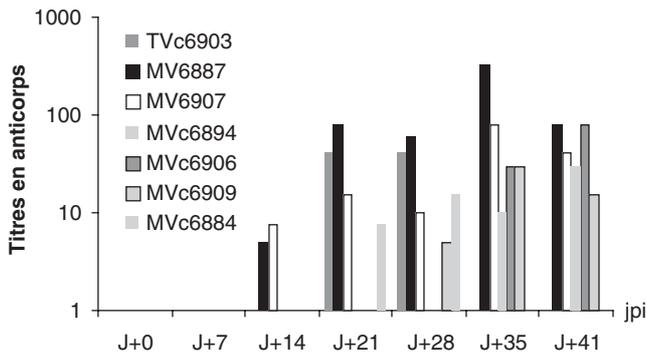
2.4. Etude de la réponse immunitaire

La représentation graphique des titres en anticorps de la figure 3 révèle un délai de deux semaines dans la sérocon-

Tableau 3 - Résultats de la recherche de l'ARN viral du virus de la PPC dans le sang par RT-PCR

Souches	JPI	J+3	J+10	J+12	J+14	J+19	J+24	J+28	J+31	J+38	J+41
TV	6885	+	+								
	6889	+	+								
	6899	+	+								
	6900	+	+	+							
	6913	+	+								
MV	6895	+	+	+	+	+	+	+			
	6887	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6898	+	+	+	+	+					
	6902	+	+	+	+						
	6907	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TVc	6886	-	+	+	+	+					
	6903	-	+	+	+	+	+				
	6915	-	-	-	+	+	+				
	6916	-	-	-	+	+					
MVc	6884	-	-	-	+	+	+	+	+		
	6894	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	6906	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	6909	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

TV (porcs inoculés par la souche Très Virulente) ; TVc (porcs en contact indirect avec les animaux TV) ; MV (porcs inoculés par la souche moyennement virulente) ; MVc (porcs en contact indirect avec les animaux MV).



TV6903 : porc inoculé par la souche très Virulente présentant une séroconversion ;
 MV6887, MV6907 : porcs inoculés par la souche Moyennement Virulente présentant une séroconversion ;
 MVc6894, MVc6906, MVc6909, MVc6884 : porcs en contact indirect avec les porcs inoculés par la souche MV présentant une séroconversion.

Figure 3 - Représentation graphique de la séroconversion

version des porcs directement infectés développant une immunité humorale. Chez les animaux infectés par la souche *Eystrup*, un seul porc développe une immunité humorale. Il s'agit d'un porc inoculé. Aucune des sentinelles ne produit d'anticorps neutralisants contre le virus de la PPC. Concernant la souche *Paderborn*, 3 animaux inoculés et 3 contacts survivent à la contamination et développent des anticorps neutralisants. Les porcs ne développant pas une réponse humorale ne survivent pas à l'infection par le virus de la PPC. Ce sont surtout les animaux contaminés par la souche *Paderborn* qui développent une réponse humorale : la virulence de la souche intervient donc dans la mise en place d'une réponse humorale. La sécrétion de l'IFN γ permet de mettre en évidence de façon rapide la mise en place d'une éventuelle réponse immune cellulaire. Les résultats du dosage quantitatif de la sécrétion d'IFN γ par ELISA représentés sur la figure 4 montre que cette molécule n'est produite ni chez les animaux sains, ni chez les porcs infectés par la souche *Eystrup* (directement infectés ou contact). L'augmentation de la quantité d'IFN γ concerne uniquement les animaux inoculés par la souche *Paderborn*. Cette sécrétion démarre à partir de la troisième semaine après infection et semble ponctuelle puisqu'après un pic de sécrétion, les

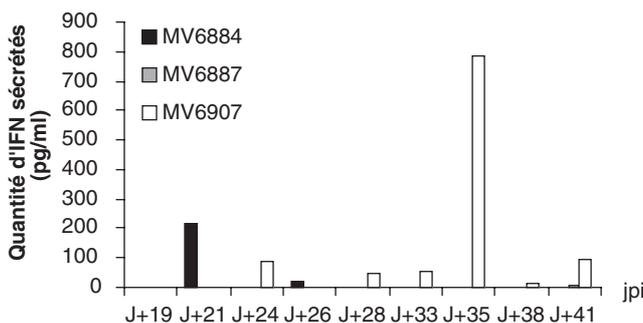


Figure 3 - Mesure de la quantité d'IFN γ sécrétée par les porcs inoculés par la souche *Paderborn*

quantités d'IFN γ retrouvent des valeurs faibles. Cette apparition tardive de cette réponse immune permet de supposer que chez les porcs directement infectés par la souche *Eystrup*, l'absence de détection d'IFN γ est due à la mort des animaux avant le développement de cette réponse. Chez les porcs sentinelles de la souche *Paderborn*, une sécrétion négligeable apparaît à la fin de l'étude expérimentale. L'expérimentation a donc été arrêtée trop tôt pour qu'une réponse immune cellulaire puisse être mise en évidence chez ces animaux. L'étude de la réponse humorale et cellulaire révèle une influence de la virulence sur le développement de l'immunité.

CONCLUSION

Les résultats de ces études montrent l'importance de la virulence des souches du virus de la PPC sur les réactions cliniques et biologiques ainsi que sur leur propagation indirecte à des porcs sains. Au niveau clinique, la méthode de MITTELHOZER et al., (2000) a permis de quantifier *in vivo* l'influence de la virulence sur l'expression clinique de la maladie. Ainsi, l'observation clinique a révélé l'influence de la virulence sur l'intensité des symptômes et leur délai d'apparition. Lors d'une contamination par une souche moyennement virulente, les réactions cliniques sont atténuées et apparaissent de façon plus tardive que lors d'une contamination par une souche très virulente. Cette application a confirmé l'efficacité de cette méthode pour évaluer la virulence d'une souche virale PPC et pour repérer les animaux ayant réussi à développer une réponse immune.

La virulence des souches influe également sur leur diffusion : les porcs en contact indirect avec ceux inoculés par la souche très virulente extériorisent des symptômes plus tôt que les sentinelles des porcs inoculés par la souche moyennement virulente, soulignant ainsi une plus grande diffusion pour une souche de forte virulence. De plus, le retard dans l'apparition des premières réactions cliniques par rapport à la première détection du génome viral par RT-PCR est d'environ 6 jours de plus pour les porcs en contact indirect avec les porcs directement infectés par la souche moyennement virulente que pour les sentinelles de ceux inoculés par la souche très virulente. L'étude de la réponse immune montre également l'influence de la virulence sur le développement d'une immunité (humorale et cellulaire) puisque ce sont essentiellement les animaux contaminés par une souche de virulence modérée qui développent une réponse immune. La comparaison des deux types de réponses immunitaires met en évidence que la réponse humorale est plus précoce que la réponse cellulaire. De plus, tous les porcs produisant de l'IFN γ sécrètent également des anticorps neutralisants. Ainsi, la réponse humorale accompagne toujours une réponse cellulaire. Il semblerait cependant que la réponse humorale soit suffisante pour induire une survie ; en effet, le porc n°6887 a développé une réponse humorale alors que la production d'IFN γ est insignifiante. Cependant, même si les porcs infectés par une souche moyennement virulente ont plus de chance de récupérer que ceux contaminés par une souche très virulente, le développement d'une réponse immune est un processus lent d'environ deux semaines. Ainsi, lors de la mise en place d'une réponse immune, le virus est toujours

présent dans l'organisme et ces animaux constituent donc pendant ce temps de véritables réservoirs à virus.

Toutes ces constatations soulignent donc l'importance épidémiologique de la virulence de la souche impliquée dans une infection par le virus de la PPC et la nécessité de diagnostiquer de façon précoce une contamination PPC.

Pour compléter les résultats obtenus lors de ces premiers travaux, une nouvelle étude expérimentale va être mise en place afin d'évaluer l'impact du facteur aéroporté dans la propagation du virus de la PPC entre animaux. Cette nouvelle étude devra permettre de calculer le taux de reproduction de base (R_0) décrit par LAEVENS et al (1998) et

KLINKENBERG et al (2002) et permettre ainsi de mieux quantifier les facteurs de risque de contamination.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le laboratoire de référence de l'union européenne de la PPC d'Hannovre (Allemagne) pour nous avoir fourni la souche *Paderborn*, le laboratoire d'Artur Summerfield (Suisse) pour nous avoir fourni la souche *Eystrup* et la société CEVA-PHYLAXIA de Budapest (Hongrie) pour nous avoir fourni la souche *Thiverval*.

Ils tiennent également à remercier Benoît DURAND du laboratoire d'épidémiologie d'Alfort pour ses conseils.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- KLINKENBERG D., DE BREE J., LAEVANS H., DE JONG M.C.M., 2002. *Epidemiol. Infect.* 128 , 293-299.
- LAEVENS H., KOENEN F., DELUYKER H., BERKVEN D., DE KRUIF A., 1998. *Vet Q* 20 , 41-5.
- MCGOLDRICK A., LOWINGS JP., IBATA G., SANDS JJ., BELAK S., PATON DJ., 1998. *J Virol Methods* 72 , 125-35.
- MITTELHOZER C., MOSER C., TRATSCHIN J.D., HOFMAN M.A., 2000. *Veterinary microbiology* 74 , 293-308.
- WENSVOORT G., TERPSTRA C., 1985. *Hog Tijdschr Diergeneeskd* 110 , 263-9.
- WENGLER G., BRADLEY D.W., COLLETT M.S., HEINZ F.X., SCHLESINGER R.X., STRAUSS J.H., FLAVIRIDAE. In : MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP D. GH.L., GHABRIAL S.A., JARVIS A.W., MARTELLI G.P., MAYO M.A., SUMMERS M.D., 1995. Eds., Springer, Vienna, 415-427.

