

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI ENCEFALOMIOCARDITE IN UN ALLEVAMENTO SUINO

DESCRIPTION OF AN OUTBREAK OF ENCEPHALOMYOCARDITIS IN A PIG HERD

CALISESI L.¹, LUPPI A.³, BIANCHI M.², SARLI G.⁴, GELMETTI D.³,
MORANDI F.⁴, BONILAURI P.³, DOTTORI M.³, MERIALDI G.³

¹ Gruppo Amadori, San Vittore di Cesena (FC); ² Merial Italia; ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ⁴ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna.

Parole chiave: encefalomiocardiocivirus, focolaio, indagini di laboratorio.

Key words: encephalomyocarditis virus, outbreak, laboratory investigations.

Riassunto. Viene descritto un focolaio di Encefalomiocardite da EMCV in un allevamento suino da riproduzione del Nord Italia. L'episodio ha coinvolto il sito 1 dell'azienda presso il quale sono allocate 3000 scrofe. Il focolaio è stato caratterizzato da elevata mortalità dei suinetti lattanti con assenza di sintomi clinici o con segnali aspecifici (anoressia, tremori, dispnea) osservabili per breve tempo prima della morte. La mortalità si è protratta per oltre un mese interessando complessivamente 1087 suinetti (15% degli animali sottoscrofa presenti). La mortalità intra-nidiata è risultata variabile da 0 a 100% La diagnosi di Encefalomiocardite da EMCV è stata effettuata tramite accertamenti necroscopici, biomolecolari (rt-PCR), istologici ed immuno-istochimici. Nelle scrofe non si è registrato un aumento delle problematiche riproduttive. Nel sito 2 dell'allevamento, nel quale sono trasferiti i soggetti svezzati a circa 28 giorni di vita, non è stato accertato nessuna caso di malattia riconducibile a EMCV e la mortalità si è mantenuta negli standard dell'allevamento. Indagini epidemiologiche retrospettive sulle scrofe (sierologia) e su alcuni ratti dell'allevamento non hanno fornito indicazioni utili alla comprensione della grande variabilità nel tasso di mortalità fra diverse nidiate né sull'origine dell'infezione.

Abstract. An outbreak of Encephalomyocarditis (EMCV) in a multisite pig herd of Northern Italy is reported. The disease has involved only site 1 of the herd, where 3000 sows are allocated. The outbreak was characterized by high mortality rates in suckling piglets. Sudden death was the most frequently observed occurrence, in some piglets it was possible to observe anorexia, trembling and dispnea. Mortality persisted for more than one month and a total of 1087 piglets (15% of all piglets) died. Mortality rate ranged from 0 to 100% in different litters. The diagnosis of EMCV infection was performed by necropsy, rt-PCR, histopathology and immunohistochemistry. The productive performance of sows did not result affected. In site 2, receiving piglets after weaning at 28 days of life, no cases of EMCV were reported and mortality was not increased during the outbreak. Retrospective epidemiological investigations on sows (serology) and rats did not lead to better understanding of the reasons of such high variability in mortality rates in different litters and of the source of the infection.

INTRODUZIONE

Il virus della encefalomiocardite (EMCV) è un RNA-virus appartenente al genere *Cardiovirus* ed alla famiglia *Picornaviridae*. EMCV comprende al proprio interno molteplici ceppi caratterizzati da diversa virulenza ma che appartengono tutti al medesimo sierotipo

[Knowles *et al.*, 1998; Oberste *et al.*, 2009]. L'abilità di EMCV nel provocare infezioni in diverse specie animali ha portato a segnalazioni di focolai di encefalomiocardite in diversi giardini zoologici in Australia [Reddacliff *et al.*, 1997], negli Stati Uniti ed in Sud Africa [Grobler *et al.*, 1995], ed in Italia [Canelli *et al.*, 2010] dove la malattia è stata descritta in lemuri, scoiattoli, macachi, mandrilli, scimpanzé, ippopotami ed elefanti. Nella specie suina EMCV viene riconosciuto come causa di miocardite nei suinetti e di disordini riproduttivi nelle scrofe. Nei primi è descritta una forma fulminante, con morte improvvisa o con modici sintomi premonitori caratterizzati da eccitazione, ed una forma acuta dove si osservano manifestazioni cliniche con febbre, inappetenza, anoressia e paralisi progressiva. La mortalità è variabile e generalmente più elevata in suini di poche settimane d'età fino a 2 mesi di vita, dove la morte è attribuibile ad arresto cardiaco o ad aritmia acuta. Una certa percentuale di animali può presentare infezioni sub-cliniche e mostrare la presenza di anticorpi neutralizzanti nei confronti di EMCV. Le lesioni anatomopatologiche osservate alla necropsia sono caratterizzate da idrotorace, idropericardio e ascite, accompagnate da necrosi miocardiche rotondeggianti o allungate, di 2-10 mm di diametro. Le lesioni sono soprattutto evidenti a livello di epicardio ventricolare destro e tendono ad interessare il miocardio sottostante. I polmoni si presentano generalmente congesti ed edematosi, mentre le meningi possono mostrare una lieve congestione vasale o non presentare lesioni di rilievo. Il quadro istologico è caratterizzato da una miocardite con infiltrazione di cellule infiammatorie linfomononucleate, preceduta e accompagnata da alterazioni di tipo degenerativo-necrotico. Talvolta è possibile osservare una meningoencefalite, con presenza di manicotti perivasali di mononucleati e di degenerazione neuronale a carattere focale [Gelmetti *et al.*, 2006; Papaioannou *et al.*, 2003].

Nelle scrofe si osserva la comparsa di aborto a carattere sporadico generalmente nella parte terminale del periodo di gravidanza (107-111 giorni di gestazione), con aumento dei nati morti e dei feti mummificati. Le scrofe non presentano generalmente sintomi, eccezion fatta per la comparsa di febbre e disoressia. Fenomeni di ipofertilità, della durata di alcune settimane, possono persistere nelle scrofe che hanno abortito.

La diffusione del virus all'interno dell'allevamento suino è principalmente sostenuta da ratti o da altri roditori (contaminazione degli alimenti e dell'acqua con feci ed urine) e questo spiegherebbe anche il carattere stagionale della malattia. La trasmissione verticale e orizzontale suino-suino è una via altrettanto possibile ma, con ogni probabilità, meno efficace di quella precedentemente descritta [Knowles *et al.*, 1998; Koenen *et al.*, 1999]. Prove d'infezione sperimentale nel suino hanno dimostrato come la viremia abbia una durata di soli 3-4 giorni post-infezione e l'eliminazione del virus attraverso le feci persista per circa 7 giorni post-infezione [Dea *et al.*, 1991; Koenen *et al.*, 1994; Koenen and Vanderhallen, 1997].

Studi recenti dimostrano che EMCV è diffuso a livello europeo [Augustijn *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2006; Kluivers *et al.*, 2006; Maurice *et al.*, 2005] così come a livello mondiale, dove gli isolamenti del virus dal suino e le positività sierologiche indicano l'importante diffusione del patogeno [Oberste *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 1993].

Scopo del presente lavoro è riportare i quadri clinici ed anatomopatologici nonché l'approccio diagnostico nell'ambito di un focolaio di EMCV in un allevamento suino situato in provincia di Brescia, approfondendo in particolare gli aspetti macroscopici e microscopici di maggiore rilievo ed utilità ai fini diagnostici differenziali.

MATERIALI E METODI

Descrizione del focolaio

L'episodio si è verificato nel sito 1 di un allevamento multisito, composto da circa 3000 scrofe in produzione, a rimonta esterna, che prevedeva lo spostamento dei suinetti a circa 28

giorni di vita in svezzamenti esterni. L'allevamento è situato nella zona Sud della provincia di Brescia, caratterizzata da una alta concentrazione di allevamenti suini, già teatro, alla fine degli anni novanta di numerosi focolai di EMCV [Maurice *et al.*, 2005].

Nell'allevamento gli interventi di derattizzazione sono effettuati con regolarità e il livello di infestazione da parte di ratti e topi era ed è relativamente basso. A partire dagli ultimi giorni di Settembre 2010, in concomitanza con l'abbassarsi della temperatura, è stata rilevata una mortalità improvvisa dei suinetti in sala parto che si è protratta fino alla seconda settimana di Novembre. La mortalità ha coinvolto i suinetti lattanti di ogni età ed ha avuto un andamento assai incostante nelle sale parto, nelle quali sono state osservate nidiate con perdite del 100% ed altre in cui i sintomi sono stati totalmente assenti. In particolare la mortalità si è inizialmente presentata in 4 stanze in cui si trovavano suinetti di circa 7 giorni di vita e poi si è diffusa a tutto il settore nell'arco di circa 15 giorni.

La sintomatologia clinica che precedeva la morte dei suinetti era molto scarsa e in alcuni soggetti è stato possibile osservare anoressia, tremori e dispnea ed una temperatura corporea superiore a 41°C. Tali sintomi erano più frequenti nei soggetti oltre i 14 – 21 giorni di vita, mentre nei suinetti deceduti durante la prima settimana la morte non era preceduta da alcuna forma clinica. In totale sono morti, con tale sintomatologia, 1087 animali corrispondenti al 15,6% dei suinetti presenti in allevamento. Il 40% dei soggetti deceduti avevano meno di 7 giorni di vita, il 30% tra gli 8 ed i 14 giorni, il 25% tra i 15 ed i 21 ed il 5% tra i 21 ed i 28 giorni.

Negli svezzamenti esterni dove gli animali provenienti dal sito 1 oggetto del focolaio e da altri siti 1 vengono movimentati a circa 28 giorni di vita, non sono stati osservati sintomi o mortalità riconducibili all'episodio precedentemente descritto.

E' inoltre opportuno segnalare che nel corso di questo focolaio non si sono verificati problemi di carattere riproduttivo nelle scrofe presenti in allevamento.

Indagini di laboratorio

In concomitanza con i primi episodi di incremento della mortalità, le carcasse di 12 suinetti di cui 3 di 21 giorni di vita e 9 di 7 giorni d'età, sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e ad indagini di laboratorio.

L'esame necroscopico è stato eseguito secondo metodiche standardizzate presso il laboratorio e dal materiale patologico prelevato durante le necroscopie sono state condotte indagini batteriologiche e virologiche. Durante la necroscopia sono stati prelevati campioni di intestino da sottoporre ad indagini batteriologiche su agar sangue, sia in aerobiosi sia in anaerobiosi. Su campioni di rene e milza, prelevati da ogni soggetto, è stato eseguito l'esame batteriologico mediante metodiche standard. Sono stati inoltre prelevati diversi tessuti, organizzati in pool da 3, per l'esecuzione di indagini virologiche. In particolare, da ogni soggetto, sono stati prelevati la milza ed i polmoni per la ricerca del virus della PRRS tramite rt-PCR [Bonilauri *et al.*, 2003], il cuore per la ricerca di EMCV sempre tramite rt-PCR [Bakkali Kassimi *et al.*, 2002], il fegato ed il cervello per la ricerca del virus della Malattia di Aujeszky tramite PCR [Katz and Pedersen, 1992].

Campioni di milza, rene, fegato, stomaco, intestino, pancreas, linfonodi mesenterici, mediastinici e inguinali superficiali, cuore, polmone e cervello sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo a 5 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo le metodiche in uso.

Un'indagine immunistochemica è stata eseguita su sezioni di miocardio mediante anticorpo monoclonale 3E5 (diluito 1:500) che riconosce l'epitopo lineare della proteina capsidica VP1 di EMCV, impiegando ; come sistema di rivelazione il Novolink Polymer (Novocastra) e come cromogeno il Novared (Vector).

Quattro settimane dopo l'inizio della mortalità nei suinetti sono stati prelevati 20 campioni

di sangue su altrettante scrofe (di cui 10 da madri di nidiata colpite dalla grave forma clinica descritta e 10 da madri di nidiata in cui i suinetti non hanno presentato alcun sintomo durante il focolaio) da sottoporre alla ricerca di anticorpi anti-EMCV mediante test ELISA competitivo, sviluppato da IZSLER, basato sull'uso di anticorpi monoclonali, volto a verificare la presenza di anticorpi nei confronti di EMCV.

Un mese dopo l'inizio della mortalità in allevamento sono stati catturati 5 ratti dall'allevamento in cui si è verificato il focolaio e su questi è stata condotta la ricerca di EMCV tramite PCR su un pool di visceri costituito da intestino, milza, cuore e cervello.

RISULTATI

L'esame anatomopatologico ha evidenziato lesioni ricorrenti negli animali esaminati caratterizzate da congestione pluriviscerale, da edema polmonare, da un versamento sieroso pleurico e pericardico. A livello del cuore erano evidenti rari focolai di colore biancastro osservabili sia a livello epicardio sia miocardico. Le lesioni macroscopiche apparivano più gravi nei soggetti di 3-4 settimane d'età, mentre negli animali fino ad una settimana di vita erano praticamente assenti.

Le indagini batteriologiche hanno fornito informazioni non significative mentre gli esami in PCR per la ricerca del virus della PRRS e della Malattia di Aujeszky sono costantemente risultati negativi. Tutti i campioni testati in PCR per la ricerca di EMCV sono risultati positivi.

Le indagini istopatologiche non hanno evidenziato lesioni di rilievo a livello di milza, rene, fegato, stomaco, intestino, pancreas, linfonodi mesenterici, mediastinici ed inguinali superficiali.

A livello cardiaco è stata evidenziata una miocardite interstiziale acuta da multifocale a diffusa abbinata ad una lieve epicardite. In sezioni istologiche del miocardio, ottenute trasversalmente a livello di massa ventricolare, in modo da comprendere pareti ventricolari e setto interventricolare, erano presenti focolai multipli e confluenti di flogosi con accumulo interstiziale di linfociti, macrofagi e neutrofili con nucleo carioretico localizzati prevalentemente nella parete ventricolare sinistra e nel setto interventricolare. L'infiltrato aveva distribuzione multifocale ed era presente anche a livello sub-epicardico e sub-endocardico. Nelle aree di flogosi le miofibre presentavano una perdita di definizione dei limiti cellulari accompagnata da frammentazione del citoplasma che appariva maggiormente eosinofilo (necrosi coagulativa). Le miofibre apparivano occasionalmente distanziate da moderato edema. A livello di epicardio erano presenti accumulo di fibrina, attivazione del mesotelio e non frequentemente infiltrato cellulare misto. La reazione immunoistochimica ha prodotto positività focale che, a forte ingrandimento, appariva localizzata a livello del citoplasma dei miocardiociti.

Il parenchima polmonare mostrava diffusa iperemia abbinata ad accumulo di materiale alveolare eosinofilo riferibile ad edema e talvolta ad emorragie interstiziali ed intralveolari. Con distribuzione multifocale alcuni alveoli mostravano presenza di materiale acidofilo di aspetto fibrillare riferibile a fibrina contestualmente al quale si rileva lieve desquamazione alveolare. Tale materiale era occasionalmente presente anche nell'interstizio peri-broncovascolare ed interlobulare. Era inoltre presente un diffuso ma debole infiltrato di mononucleati (linfociti e macrofagi) e rari granulociti neutrofili nell'interstizio. La pleura è localmente infiltrata da rari granulociti neutrofili.

Nessuna lesione istologica è stata riscontrata a livello di encefalo.

Le indagini sierologiche per EMCV hanno evidenziato 19 animali su 20 positivi, senza differenze tra scrofe la cui nidiata aveva subito perdite del 100% e scrofe i cui suinetti non avevano mostrato alcuna sintomatologia.

La ricerca di EMCV dai ratti catturati nell'allevamento hanno dato esito negativo in tutti i casi.

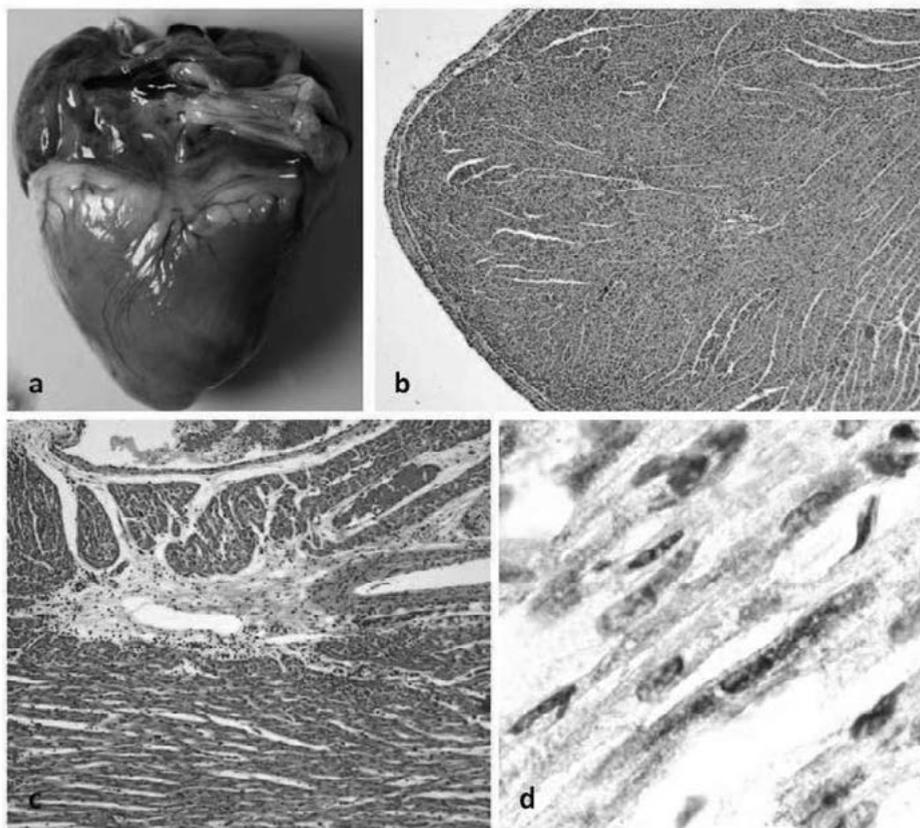


Figura 1: cuore di suinetto di 3 settimane di età. Aspetto macroscopico (a) di un focolaio di colore biancastro localizzato nella parete ventricolare sinistra. Miocardite interstiziale acuta in un focolaio superficiale, con associata reazione epicardica (b), e profondo (c). Reazione immunohistochimica positiva per EMCV nel citoplasma di miocardiociti (d)

Figure 1: heart of a 3 weeks old piglet. Macroscopic feature of a heart lesion (a). Interstitial acute myocarditis (b, c) and epicarditis (b). Immunohistochemistry to EMCV showing brown cytoplasmic stain in myocardiocytes (d).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stato descritto, in un allevamento intensivo situato in provincia di Brescia, un grave focolaio di malattia sostenuto da EMCV. L'identità del virus è stata dimostrata tramite una rt-PCR e l'evidenziazione delle caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche in abbinamento alla positività della reazione immunohistochimica, hanno ulteriormente confermato il risultato ottenuto a livello biomolecolare. In un lavoro del 2005 di Maurice *et al.* viene riportato come i focolai di encefalomiocardite nel suino si presentino in modo ricorrente in specifiche aree geografiche. Come già accennato l'allevamento oggetto del lavoro si trova in una zona geografica che nel corso degli ultimi 20 anni è stata teatro di numerosi focolai di EMCV e che può quindi essere considerata endemica. Come già descritto

nella parte introduttiva, i roditori si comporterebbero da serbatoio dell'infezione e sarebbero la principale causa di introduzione o reintroduzione del virus in allevamento. In tal modo la migrazione di topi e ratti all'interno degli allevamenti suini per carenza di cibo o l'aumento della popolazione di roditori in una determinata area, favorirebbero la diffusione di EMCV dai roditori ai suini e spiegherebbe il carattere stagionale dei focolai osservati in diversi paesi europei. Il risultato ottenuto nel presente lavoro dall'indagine in PCR per EMCV, sui tessuti prelevati da ratti catturati all'interno dell'allevamento, necessita di ulteriore approfondimento, sia per l'esiguità del campione sia per il fatto che il campionamento è stato effettuato diverse settimane dopo la comparsa della mortalità nei suinetti.

La gravità della forma clinica osservata è imputabile a diversi fattori, dipendenti sia dall'ospite, sia dal ceppo di EMCV responsabile del focolaio. Per quanto riguarda il primo punto, nel caso descritto in questo lavoro, il ceppo di EMCV una volta entrato nell'allevamento ha trovato una popolazione estremamente recettiva, in molti casi probabilmente priva di una protezione immunitaria nei confronti di EMCV. In questo senso è stata descritta in letteratura una maggior incidenza della forma clinica nei suinetti lattanti, dipendente da una elevata suscettibilità del tessuto cardiaco di questi animali, che può essere aggravata dall'assenza di una solida immunità protettiva colostrale [Maurice *et al.*, 2005]. Esiste inoltre una diversa patogenicità e tropismo tissutale tra i differenti ceppi di EMCV. In questo contesto, in seguito ad infezione da EMCV possono essere osservati quadri anatomo-patologici differenti, in certi casi con assenza delle tipiche lesioni macro e microscopiche a livello di miocardio [Dea *et al.*, 1991].

Come evidenziato nei risultati, tutte le scrofe sottoposte ad indagini sierologica per EMCV sono risultate positive, eccetto una. I risultati dell'indagine sierologica si basano su un unico prelievo eseguito in fase convalescente che non permette di discriminare tra sier conversionsi e positività pregresse. Nonostante questo è possibile ipotizzare che le nidiate che non hanno presentato sintomatologia fossero protette da una solida immunità passiva, trasmessa con il colostro da scrofe già sieropositive per precedente esposizione ad EMCV. Per contro le nidiate che hanno presentato la sintomatologia clinica descritta provenivano probabilmente da scrofe sieronegative al momento dell'introduzione di EMCV in allevamento. Indagini sierologiche eseguite in diversi paesi europei hanno evidenziato elevate sieroprevalenze per EMCV sia all'interno che all'esterno di aree considerate endemiche, dove la forma sub-clinica dell'infezione da EMCV è evento tutt'altro che raro [Maurice *et al.*, 2005].

L'encefalomiocardite sostenuta da EMCV, come dimostrato nel caso clinico riportato, è da considerarsi una patologia che in determinate condizioni è in grado di produrre gravissime perdite nell'allevamento suino e per la quale ulteriori studi sono necessari per arrivare ad una esaustiva comprensione dei numerosi interrogativi epidemiologici non ancora chiariti.

BIBLIOGRAFIA

- Augustijn M., Elbers A.R., Koenen F., Nielen M. (2006). Estimation of seroprevalence of encephalomyocarditis in Dutch sow herds using the virus neutralization test. *Tijdschr Diergeneeskd* 15; 131 (2): 40-44.
- Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002). Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 101 (2002) 197-206.
- Bakkali K., Madec F., Guy M., Boutrouille A., Rose N., Cruciere C. (2006). Serological survey of encephalomyocarditis virus infections in pigs in France. *Vet Rec* 14; 159 (16): 511-514.
- Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on

- Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, 2003, pp.98-99.
- Canelli E., Luppi A., Lavazza A., Lelli D., Sozzi E., Martin A.M., Gelmetti D., Pascotto E., Sandri C., Magnone W., Cordioli P. (2010). Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. *Virology* 50: 18-24.
 - Dea S.A., Bilodeau R., Martineau G.P. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. *Arch Virol.* 117; 121-128.
 - Gelmetti D., Meroni A., Brocchi E., Koenen F., Cammarata G. (2006). Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. *Vet Res.* 2006 Jan-Feb;37(1):15-23.
 - Grobler D.G., Raath J.P., Braack L.E., Keet D.F., Gerdes G.H., Barnard B.J., Kriek N.P., Jardine J., Swanepoel R. (1995). An outbreak of encephalomyocarditis-virus infection in free-ranging African elephants in the Kruger National Park. *Onderstepoort J Vet Res.* 1995 Jun;62(2):97-108.
 - Katz J.B. & Pedersen J.C. (1992). Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms 187-195 *Biologicals* 20,187-195.
 - Kluivers M., Maurice H., Vyt P., Koenen F., Nielen M. (2006). Transmission of encephalomyocarditis virus in pigs estimated from field data in Belgium by means of R_0 . *Vet Res.* 37; 757-766.
 - Knowles N.J., Dickinson N.D., Wilsden G., Carra E., Brocchi E., De Simone F. (1998). Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. *Virus Res* 57: 53-62.
 - Koenen F., De Clercq K., Lefebvre J., Strobbe R. (1994). Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate. *Vet Microbiol.* 39: 111-116.
 - Koenen F., Vanderhallen H. (1997). Comparative study of the pathogenic properties of a Belgium and Greek EMCV isolate for sows in gestation. *Zentralbl Veterinarmed B* 44: 281-286.
 - Koenen F., Vanderhallen H., Castryck F., Miry C. (1999). Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium. *Zentralbl Veterinarmed B.* May; 46 (4): 217-231.
 - Maurice H., Nielen M., Brocchi E., Nowotny N., Bakkali Kassimi L., Billinis C., Loukaides P., O'Hara R.S., Koenen F. (2005). The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001. *Epidemiol Infect* 133; 547-557.
 - Oberste S.M., Gotuzzo E., Blair P., Nix A.W., Ksiazek G.T., Comer J.A., Rollin P., Goldsmith S., Olson J., Kochel T.J. (2009). Human Febrile Illness Caused by Encephalomyocarditis Virus Infection, Peru. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 15.
 - Papaioannou N., Billinis C., Psychas V., Papadopoulos O., Vlemmas I. (2003). Pathogenesis of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets during the viraemia phase: a histopathological, immunohistochemical and virological study. *J Comp Pathol.* 129 (2-3): 161-168.
 - Reddacliff L.A., Kirkland P.D., Hartley W.J., Reece R.L. (1997). Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J Zoo Wildl Med.* 1997 Jun;28(2):153-7.
 - Zimmerman J., Schwartz K., Hill H.T., Meetz M.C., Simonson R., Carlson J.H. (1993). Influence of dose and route on transmission of encephalomyocarditis virus in swine. *J Vet Diagn Invest* 5: 317-321.