

# **FOCOLAI DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV) IN TRE ALLEVAMENTI DA RIPRODUZIONE APPARTENENTI ALLA STESSA AZIENDA DI PRODUZIONE SUINICOLA**

## ***OUTBREAKS OF ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS (EMCV) INFECTION IN THREE BREEDING HERDS OF THE SAME PIG PRODUCTION FARM***

NIGRELLI A.D.<sup>1</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>1</sup>, FACCINI S.<sup>1</sup>, GAMBA F.<sup>2</sup>,  
FRANZINI G.<sup>1</sup>, SARLI G.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, B. Ubertini;

<sup>2</sup>Medico Veterinario Libero Professionista;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna

**Parole chiave:** suino, virus dell'encefalomiocardite, EMCV

**Key words:** swine, encephalomyocarditis virus, EMCV

### **Riassunto.**

Nel presente lavoro vengono riportati i dati relativi a focolai di mortalità improvvisa in suinetti in lattazione e aumento di nati-morti e feti mummificati al parto, comparsi contemporaneamente in tre allevamenti da riproduzione (A, B e C), appartenenti allo stessa azienda suinicola. Le tre unità produttive, due nella provincia di Mantova e una nella provincia di Brescia, erano dislocate a più di 20 Km di distanza l'una dall'altra. In un allevamento (A) la mortalità ha coinvolto anche il reparto delle scrofette da rimonta, nella fase di peso vivo compresa tra i 40 e i 70 Kg. Le indagini di laboratorio effettuate su suini e feti colpiti dalla patologia hanno evidenziato la presenza di una infezione da virus dell'encefalomiocardite (EMCV). EMCV è stato rilevato mediante RT-PCR in campioni di tessuto cardiaco delle diverse categorie di animali. La diagnosi è stata confermata dalla presenza di caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche. La contemporaneità dell'insorgenza dei focolai di infezione nei 3 allevamenti rende plausibile l'ipotesi di una trasmissione dell'EMCV dal sito produttivo A agli altri due (B e C) mediante il trasferimento delle scrofette da rimonta. La stima delle perdite globali causate dalle infezioni da EMCV, calcolata sullo scostamento rispetto agli indici aziendali di performance riferiti ai 4 mesi che hanno preceduto i focolai, si è attestata su 1.295 feti, 569 suinetti lattanti e 42 scrofette da rimonta. Il danno economico stimato complessivo ha superato i 76.000 euro.

### **Abstract.**

The present work shows data related to outbreaks, characterized by sudden death in lactating piglets and increased stillbirth-rate and mummified fetuses, appeared simultaneously in three breeding herds (A, B and C) of the same production farm, placed at more than 20 Km of distance. In one herd (A), mortality involved also the replacement gilts, at 40 -70 kg of live weight. Laboratory investigations, carried out on pigs and fetuses affected by the disease, showed the presence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection. The virus has been detected by RT-PCR on samples of heart tissue of different animal categories (fetuses, piglets, gilts). The diagnosis was confirmed by the presence of characteristics

myocardial histopathological lesions. The simultaneous onset of the outbreaks of infection in all the production units makes plausible the hypothesis of a EMCV transmission from the herd A to the others (B and C) through the transfer of replacement gilts. The estimated losses due these EMCV infections outbreaks, calculated on the deviation of the performance data from those of the previous four months, amounted to 1.295 fetuses, 569 piglets and 42 replacement gilts, for an economic damage exceeding 76.000 euro.

## INTRODUZIONE

Il virus dell'encefalomiocardite (EMCV) è un virus a RNA, privo di envelope, appartenente al genere *Cardiovirus* della famiglia delle *Picornaviridae* (Alexandersen *et al.* 2012). Fino a poco tempo fa tutti i ceppi di EMCV, anche se a diversa virulenza, venivano classificati in un unico sierotipo. Solo recentemente è stato isolato in Germania, da un roditore (*Apodemus sylvaticus*), un ceppo virale con una configurazione antigenica tale da ritenere possibile l'esistenza di un secondo sierotipo (Phillips *et al.* 2012). EMCV venne isolato per la prima volta in Florida nel 1945 da un primate in cattività deceduto per miocardite ed edema polmonare (Helwig e Smidt 1945). Da allora ad oggi l'infezione è stata dimostrata in molte specie animali, compreso l'uomo, in diverse aree del mondo (Pope 1960, Tesh 1978). I roditori, specialmente topi e i ratti, sono considerati gli ospiti naturali e perciò i principali serbatoi dell'agente virale (Billinis 2009). Nei ratti, in particolare, il virus viene escreto con le feci e le urine anche per più settimane dopo il contagio (Spyrou *et al.* 2004).

Nella maggior parte delle specie animali, così come nell'uomo, l'infezione da EMCV è per lo più asintomatica. In questo contesto fanno eccezione il suino domestico e alcune specie animali allevate nei parchi zoologici (Canelli 2010). Nell'allevamento suino le forme cliniche di infezione da EMCV, sebbene sporadiche, quando si manifestano in forma di focolaio possono arrecare rilevanti danni economici. A partire dagli anni '90, infatti, diverse sono state le segnalazioni riguardanti episodi caratterizzati da elevati tassi di morbilità e mortalità (Knowels *et al.* 1998; Koenen *et al.* 1999; Candotti *et al.* 1997, Maurice *et al.* 2005, Sandri *et al.* 2012). Nel continente europeo, in particolare in Belgio e in Italia, sono state individuate delle "aree endemiche" nelle quali la varie forme della malattia si manifestano con una maggiore frequenza (Maurice *et al.* 2005). Nell'area endemica italiana, la pianura padana centrale, è stata riscontrata in alcuni allevamenti una prevalenza di positività sierologica negli animali anche del 60% (Maurice *et al.* 2005).

L'infezione naturale nel suino avviene per via orale. L'evoluzione verso la malattia dipende da più fattori tra cui il ceppo virale, la quantità di virus a cui è esposto l'animale e la suscettibilità di ogni singolo soggetto. Quest'ultimo aspetto è strettamente correlato con la presenza o meno di uno stato immunitario specifico nei confronti di EMCV.

Nel suino l'infezione da EMCV, quando non è asintomatica, si può manifestare in due forme principali: morte improvvisa per miocardite acuta nei soggetti giovani, specialmente nei suinetti di poche settimane di vita, e disturbi riproduttivi nella scrofa gestante (Joo 1992; Gelmetti *et al.* 2006; Christianson *et al.* 1992).

Focolai di miocardite possono colpire non solo suinetti lattanti, sicuramente i più suscettibili alla malattia, ma anche soggetti dal post-svezzamento e fino nelle fasi più avanzate dell'accrescimento (Sandri *et al.* 2012). Nei suinetti in sala-parto spesso si sviluppa una forma iperacuta con esito rapidamente letale per le gravi lesioni cardiache e il conseguente edema polmonare. A livello di nidata la mortalità può raggiungere il tasso del 100%. Nelle forme meno acute, rilevabili più spesso nei soggetti in post-svezzamento

e in accrescimento, è possibile talvolta notare alcuni segni che precedono la morte quali tremori, barcollamenti, paralisi e una forte dispnea (Joo 1992; Alexandersen *et al.* 2012). Nelle scrofe gravide l'infezione da EMCV può determinare morte fetale, specialmente nella fase tardiva della gravidanza, con aumento al parto del numero di nati- morti e di mummificati (Christianson *et al.* 1990; Dea *et al.* 1991; Kim *et al.* 1989; Koenen *et al.* 1991).

Il presente lavoro è uno studio riguardante tre importanti focolai di infezione da EMCV che hanno coinvolto, nello stesso periodo, tre allevamenti da riproduzione appartenenti alla stessa azienda di produzione suinicola.

## **MATERIALI E METODI**

### **Allevamenti coinvolti**

Gli episodi hanno interessato contemporaneamente tre distinti allevamenti da riproduzione (A, B, C). L'allevamento A e l'allevamento B, situati nel territorio della provincia di Mantova e distanti fra di loro circa 20 km, erano costituiti ognuno da circa 1000 scrofe. L'allevamento C, situato nella provincia di Brescia e distante circa 60 Km dagli altri due, contava circa 2500 scrofe. L'allevamento A era adibito alla produzione di scrofette da rimonta, fino ad un peso di 70-100 kg, destinate alle altre due unità produttive, l'allevamento B e l'allevamento C. I suinetti non destinati alla rimonta dell'unità produttiva A e tutti i suinetti delle unità produttive B e C, dopo aver raggiunto il peso di circa 30 Kg, venivano poi trasferiti in altri siti produttivi specifici per la fase di ingrasso. In tutte e 3 le unità produttive si utilizzava il sistema di gestione a "bande" con l'applicazione del "tuttovuoto tutto-pieno" e sanificazione dei locali tra un ciclo e l'altro. All'interno del piano di biosicurezza di ogni allevamento erano previsti periodici interventi di derattizzazione da parte di ditte specializzate.

Prima degli episodi oggetto della presente indagine nei tre allevamenti non erano mai stati registrati eventi sanitari riferibili a infezione da EMCV. I focolai oggetto di studio si sono manifestati nei mesi di Febbraio, Marzo e Aprile 2011. La malattia ha coinvolto sia i suinetti in sala-parto (miocardite acuta) sia le scrofe in gestazione (infezione e morte fetale). Inoltre, nell'allevamento A, infezioni letali da EMCV sono state rilevate nel reparto delle scrofette da rimonta in soggetti con peso vivo compreso tra i 40 e i 70 Kg.

### **Indagini di laboratorio**

Le carcasse dei suinetti lattanti delle 3 unità produttive, delle scrofette da rimonta di 40 – 60 kg, dei feti mummificati e dei suinetti nati morti venivano inviati alla Sezione diagnostica di Mantova dell'IZSLER per l'effettuazione di esami necroscopici ed indagini di laboratorio. Campioni di tessuti sono stati sottoposti ad esame batteriologico colturale e a ricerche virologiche mediante tecnica PCR per il virus della PRRS, per il virus della Malattia di Aujeszky, per PCV2 e per Parvovirus. Sempre mediante PCR, campioni di muscolo cardiaco sono stati esaminati per la ricerca di EMCV (Bakkaly Kassimi *et al.* 2002).

Da porzioni di tessuto miocardico di suinetti lattanti e di scrofette, fissate in formalina tamponata al 10% ed incluse in paraffina, sono state allestite sezioni per indagini istologiche mediante colorazione con ematossilina eosina.

Sei settimane dopo l'inizio dei focolai sono stati prelevati 20 campioni di sangue di scrofe, che avevano partorito durante l'episodio acuto, da ognuno dei tre siti di produzione. In

tali campioni è stata effettuata la ricerca di anticorpi anti *Leptospira* con tecnica di micro-agglutinazione lisi (MAT) e la ricerca di anticorpi anti EMCV mediante ELISA competitiva, quest'ultima sviluppata dal reparto di biotecnologie diagnostiche dell'IZSLER e basata sull'impiego di specifici anticorpi monoclonali.

### **Raccolta ed elaborazione dei dati**

I dati di performance delle tre unità produttive sono stati recuperati dal sistema di monitoraggio e registrazione aziendale nel quale erano precisamente raccolti su base mensile: numero di parti, suinetti nati vivi per parto, suinetti nati morti per parto, feti mummificati per parto, suinetti morti in lattazione per parto, numero svezzati per parto, numero medio scrofe presenti, % aborti per scrofa presente.

Per il calcolo della stima del danno economico riconducibile ai focolai di EMCV è stato in primo luogo stimato il numero dei soggetti persi nelle diverse categorie coinvolte (feti, suinetti e scrofette) calcolando lo scostamento degli indici, relativi ai periodi nei quali si è manifestata la patologia, rispetto al loro valore medio più IC 95% nei 4 mesi precedenti l'insorgenza dei focolai. Per la trasformazione delle perdite di animali in valuta è stato applicato il valore di 35,00 € per ogni feto, di 40,00 € per ogni suinetto lattante e di 200,00 € per ogni scrofetta. Tutti i calcoli sono stati effettuati mediante l'utilizzo di MS Excel 2010.

## **RISULTATI**

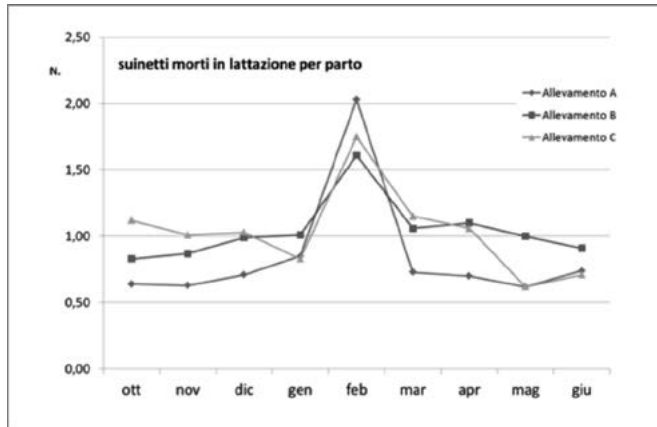
### **Dati clinici ed epidemiologici**

Nel mese di Febbraio del 2011, contemporaneamente in tutti e tre gli allevamenti (A,B e C) si è manifestato un significativo aumento della mortalità nei suinetti in sala-parto (fig. 1). La malattia ha coinvolto soggetti di tutte le età, dalla prima alla quarta settimana. Il più delle volte i suinetti venivano trovati morti senza che avessero manifestato in precedenza alcun sintomo. Nei pochi casi in cui si notava una fase clinica, sempre comunque caratterizzata da una evoluzione molto rapida, i sintomi erano rappresentati da anoressia, tremori e dispnea. Il tasso di mortalità intra-nidiata era elevato e spesso pari al 100%. Da sottolineare il fatto che nidiate contigue a quelle colpite potevano anche non manifestare alcuna forma patologica.

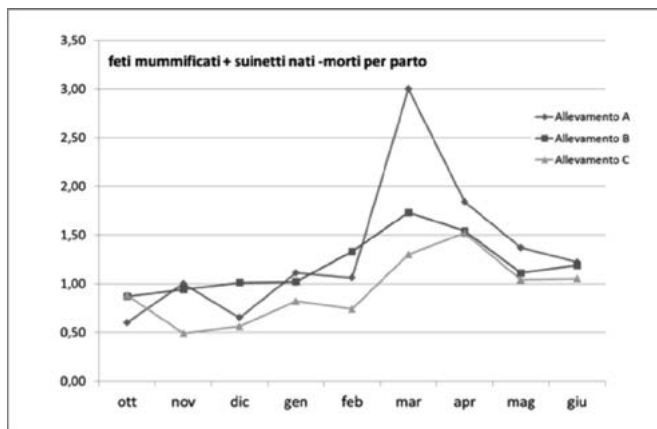
In tutte e tre le unità produttive, nei due mesi successivi rispetto a quello di riscontro dell'aumento di mortalità in sala-parto, veniva rilevato un significativo aumento del tasso di nati-morti e dei mummificati rispetto ai dati medi storici dei singoli allevamenti (fig. 2). Va sottolineato che le scrofe di tutte le classi di parto erano state coinvolte in questi eventi patologici. Al di là dei problemi riproduttivi, rare erano le manifestazioni cliniche nei riproduttori. Solo in qualche caso si è manifestato un lieve rialzo febbrile e disoressia. Nel mese di Febbraio, e ancor di più nel mese di Marzo, nell'allevamento A si registravano mortalità improvvise anche nel settore delle scrofette in accrescimento, nella fase compresa tra i 40 e i 70 kg di peso vivo (fig. 3). In alcuni casi era possibile notare una fase clinica con intensa dispnea prima della morte.

In tutte le tre unità produttive, nello stesso periodo, non è stato riscontrato un aumento significativo della mortalità nella fase post-svezzamento, ovvero da 7 a 30 kg di peso vivo.

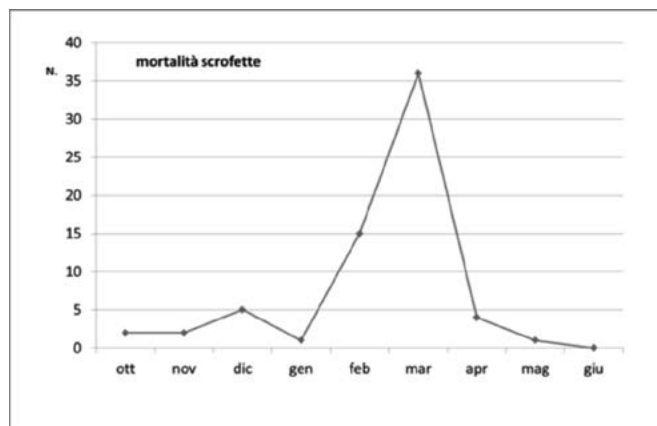
**Fig. 1.** Andamento del numero di suinetti morti in lattazione per parto  
**Fig. 1.** Trend in the number of dead piglets per litter in pre-weaning period.



**Figura 2.** Andamento del numero di feti nati-morti e mummificati per parto  
**Figura 2.** Trend in the number of stillborne and mummified fetuses per litter



**Fig.3.** Andamento della percentuale di mortalità nelle scrofette nell'allevamento A.  
**Fig.3.** Trend in the percentage of mortality in gilts in herd A.



### **Lesioni macroscopiche e indagini istologiche**

Le carcasse dei suinetti lattanti si presentavano sempre in buono stato di nutrizione e idratazione. All'apertura della cavità addominale e toracica il quadro anatomopatologico era caratterizzato da edema polmonare con emorragie sparse nel parenchima, eccesso di liquido pleurico ed ascite (fig 4). Spesso era presente schiuma in trachea. A livello cardiaco si notava pallore generalizzato e in alcuni casi emorragie sub-epicardiche.

Nelle scrofette colpite dalla malattia era frequente osservare le caratteristiche lesioni multifocali grigio-chiare nel muscolo cardiaco ventricolare (fig 5). I feti non mostravano quadri lesionali specifici.

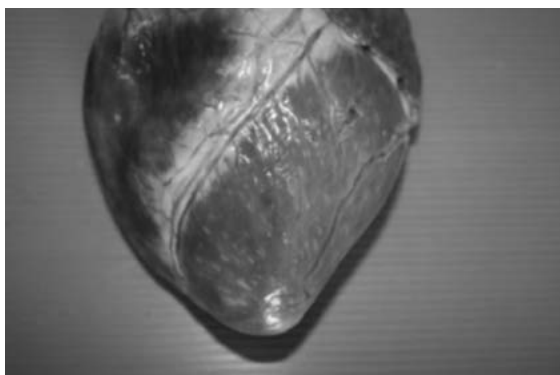
**Fig. 4.** Suinetto di due settimane di età con infezione da EMCV con edema polmonare e trasudato siero-emorragico in cavità toracica e addominale.

**Fig. 4.** Two weeks old piglet with EMCV infection showing pulmonary edema and sero-hemorrhagic transudate in thoracic and abdominal cavity



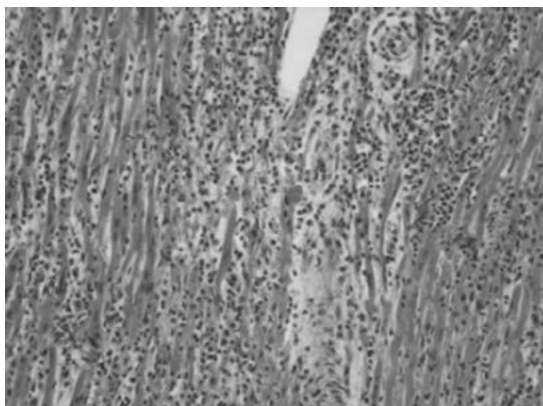
**Fig. 5.** Cuore di scrofetta con infezione da EMCV con tipiche lesioni multifocali

**Fig. 5.** Heart of gilt with EMCV infection showing typical multifocal lesions.



Dall'esame istologico dei muscoli cardiaci dei suinetti e delle scrofette veniva rilevata una miocardite interstiziale acuta multifocale grave (fig. 6).

**Fig. 6 .** Cuore di suinetto lattante con miocardite interstiziale (Ematossilina-eosina, 20x)  
**Fig. 6.** Heart of suckling piglet with interstitial myocarditis (Hematoxylin-eosin, 20x)



**Indagini microbiologiche colturali e biomolecolari**

I test batteriologici colturali non hanno fornito risultati di valore diagnostico in tutte le tipologie di soggetti e di campioni esaminati. I test PCR effettuati per la ricerca di virus della PRRS, PCV2, Aujeszky e Parvovirus sono risultati costantemente negativi. I tessuti fetali e i cuori dei suinetti lattanti e delle scrofette esaminati per EMCV hanno sempre dato esito positivo.

**Indagini sierologiche**

Gli esami sierologici su campioni di siero di scrofe dei 3 allevamenti per la ricerca di anticorpi anti Leptospira sono risultati negativi. Al contrario tutti i campioni sono risultati positivi per anticorpi anti EMCV.

**Stima delle perdite dovute a ECMV**

Nella tabella 1 vengono riportate le stime delle perdite di soggetti delle diverse categorie interessate dalla patologia (feti, suinetti, scrofette) e le relative trasformazioni del danno in valuta (€). Nella tabella 2, sono riportate le perdite totali in valuta (€) e la loro suddivisione per il numero medio di scrofe presenti in ogni allevamento..

**Tabella 1.** Stima delle perdite riconducibili a infezione da EMCV suddivise per allevamento e categoria di suini coinvolti.

**Tabella 1.** Estimate of losses due to infection with EMCV subdivided by category of swine involved.

ALLEVAMENTO	perdite per nati-morti e mummificati			perdite per mortalità nei suinetti lattanti			perdite per mortalità nelle scrofette 40-70 Kg p.v.		
	numero	costo unitario (€)	totale (€)	numero	costo unitario (€)	totale (€)	numero	costo unitario (€)	totale (€)
A	506	35,00	17.710,00	177	40,00	7.080,00	42	200,00	8.400,00
B	611	35,00	21.385,00	305	40,00	12.200,00			
C	178	35,00	6.230,00	87	40,00	3.480,00			
<b>Tot.</b>	<b>1295</b>		<b>45.325,00</b>	<b>569</b>		<b>22.760,00</b>	<b>42</b>		<b>8.400,00</b>

**Tabella 2.** Stima delle perdite riconducibili a infezione da EMCV suddivise per il numero medio di scrofe presenti nei tre allevamenti.

**Tabella 2.** Estimate of losses due to infection with EMCV subdivided by the average number of breeding sows present in the three herds.

<b>ALLEVAMENTO</b>	<b>totale perdite (€)</b>	<b>numero medio scrofe presenti</b>	<b>totale perdite per scrofa (€)</b>
<b>A</b>	33.190,00	1083	<b>30,65</b>
<b>B</b>	33.585,00	2567	<b>13,08</b>
<b>C</b>	9.710,00	992	<b>9,79</b>
<b>Tot.</b>	<b>76.485,00</b>		

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Nel presente lavoro sono stati indagati episodi di mortalità improvvisa nei suinetti in lattazione e problemi riproduttivi nelle scrofe (morte fetale) comparsi contemporaneamente in tre allevamenti appartenenti allo stessa azienda di produzione suinicola. In uno dei tre allevamenti la mortalità ha coinvolto anche il reparto delle scrofette da rimonta, nella fase di peso vivo compresa tra i 40 e i 70 Kg. Le indagini di laboratorio effettuate su animali e feti colpiti dalla patologia hanno individuato la presenza di una infezione da EMCV. Il virus è stato evidenziato mediante RT-PCR. I riscontri delle caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche hanno confermato la diagnosi emersa dai test biomolecolari.

Il sospetto di infezione da EMCV deve essere sempre tenuto in considerazione sia in caso di mortalità improvvisa dei suini lattanti (come anche in suini in post-svezzamento e in accrescimento) e sia in caso di incremento dei nati-morti e mummificati al parto, specialmente quando tali perdite fetali si manifestano nelle scrofe di diverse classi di età e non solo nelle primipare. All'esame anatomopatologico il rilievo delle caratteristiche lesioni cardiache, quando presenti, può rafforzare il sospetto clinico di infezione da EMCV. Per una diagnosi eziologica definitiva è però d'obbligo la dimostrazione della presenza del virus nei tessuti mediante specifici test quali la PCR, l'immunoistochimica o l'isolamento virale su monostrati cellulari. Tali approfondimenti diagnostici risultano ancora più indicati nelle forme che colpiscono i suinetti neonati, dove spesso non si notano lesioni macroscopiche multifocali al miocardio, o in presenza di feti nati-morti o mummificati. Nei feti può essere utile anche la ricerca degli anticorpi nei liquidi toracici (Kim *et al.* 1991; Joo 1988).

Diversi lavori hanno dimostrato che i roditori, in particolare i ratti, possono svolgere la funzione di serbatoio di EMCV e contribuire all'entrata e alla diffusione del virus negli allevamenti suinicoli. In questi animali l'infezione è spesso asintomatica e l'eliminazione dell'EMCV può persistere per diversi giorni o settimane (Spyrou *et al.* 2004). Gli alimenti contaminati da feci e urine di roditori sono considerati un'importante fonte di infezione (Alexandersen *et al.* 2012).

Un aspetto epidemiologico importante, probabilmente alla base della spiegazione del perché i focolai si sono manifestati tutti nello stesso periodo nelle tre diverse unità produttive, sta nel fatto che dall'allevamento A, con frequenza tri-settimanale, venivano trasferite delle scrofette da rimonta negli allevamenti B e C. E' possibile che l'infezione sia entrata in via prioritaria nell'allevamento A e che poi un lotto di scrofette abbia veicolato il virus nelle altre



due unità produttive. La trasmissione del virus da parte del suino ad altri suini non è così efficiente come quella operata dai roditori, ma è comunque possibile ed è stata dimostrata con prove sperimentali (Foni *et al.* 1993, Maurice *et al.* 2002).

La notevole incidenza di casi di mortalità dei suinetti in sala-parto e di problemi riproduttivi nelle scrofe gestanti registrati negli episodi indagati può ritrovare una spiegazione nella elevata recettività dei soggetti colpiti dovuta, probabilmente, all'assenza di difese immunitarie specifiche nei confronti dell'EMCV.

La perdita economica stimata riconducibile ai tre focolai di encefalomiocardite è stata di circa 76.000 euro. Va sottolineato il dato che i danni più ingenti sono risultati quelli relativi ai problemi riproduttivi (59% del danno totale) meno evidenti, da un punto di vista clinico, rispetto alle morti nei suinetti e nelle scrofette (41% del danno totale) ma più diffusi e maggiormente persistenti nel tempo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alexandersen S., Knowels N.J., Dekker A., Belsham J.G., Zhang Z., Koenen F. (2012) Picornaviruses. In Diseases of Swine 10<sup>th</sup> edition, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, Usa, pp. 587-620.
2. 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. *J. Virol. Methods*, 101:197-206.
3. Billinis C. (2009) Encephalomyocarditis Virus Infection in Wildlife Species in Greece. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2): 522–526.
4. Candotti, Carra, E., De Simone, F. and Brocchi, E. (1997). Clinical, anatomopathological and epidemiological studies, isolation and antigenic characterization of the virus in a severe encephalomyocarditis outbreak. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, Verona, Italy, 1997, p. 305-319
5. 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. *Virol J.* 7:64.
6. Christianson, W.T., Kim, H.S., Joo, H.S. and Barnes, D.M. (1990). Reproductive and neonatal losses associated with possible encephalomyocarditis virus infection in pigs. *Vet. Rec.* 126: 54-57.
7. Christianson, W.T., Kim, H.S., Yoon, I.J. and Joo, H.S. (1992). Transplacental infection of porcine fetuses following experimental challenge inoculation with encephalomyocarditis virus. *Am. J. vet. Res.* 53: 44-47.
8. Dea, S.A., Bilodeau, R. and Martineau, G.P. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. *Archives of Virology* 117: 121-128.
9. Foni, E., Barigazzi, G., Sidoli, L., Marcato, P.S., Sarli, G., Salda, L. and Della Spinaci, M. (1993). Experimental encephalomyocarditis virus infection in pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 40 (5): 347-352
10. 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
11. Helwig, F.C. and Schmidt, E.C.H. (1945). A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science* 102: 31-33.

12. Kim, H.S., Joo, H.S. and Bergeland, M.E. (1989). Serologic, virologic and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 101-104.
13. Kim, H.S., Joo, H.S., Christianson, W.T. and Morrison, R.B. (1991). Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 283-286.
14. Knowles, N.J., Dickinson, N.D., Wilsden, G., Carra, E., Brocchi, E. and De Simone, F. (1998). Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. *Virus Research* 57: 53-62.
15. Koenen, F., De Clercq, K. and Strobbe, R. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus in the offspring of swine with reproductive failure in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 60: 113-115.
16. Koenen F., Vanderhallen H., Castryck F., Miry C. (1999). Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium. *Zentralbl. Vet. Med.* 46: 217-231.
17. Joo, H.S., Kim, H.S. and Leman A.D. (1988). Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. *Arch. Virol.* 100: 131-134.
18. Joo, H.S. (1992). Encephalomyocarditis virus. In: *Diseases of Swine*, 7th edition. Ed. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire and D.J. Taylor. Chapter 17. Wolfe Publishing. pp.257-262.
19. Maurice, H., Nielen, M., Stegeman, J.A., Vanderhallen, H. and Koenen, F. (2002). Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified. *Veterinary Microbiology* 88: 301-314.
20. 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.
21. Philipps, A., Dauber, M., Groth, M., Schirrmeier, H., Platzer, M., Krumbholz, A., Wutzler, P. and Zell, R. (2012). Isolation and molecular characterization of a second serotype of the encephalomyocarditis virus. *Vet. Microbiol.* 161: 49-57.
22. Pope, J.H. and Scott, W. (1960). A survey for antibodies to encephalomyocarditis virus in man and animals. *Aust. J. exp. Biol.* 38: 447-450.
23. Sandri G.P., Alborali G.L., Corradi A., Cantoni A.M., Giovanardi D. (2012) An unusually severe case of encephalomyocarditis virus (EMCV) in nursery pig. XXII Proceedings of IPVS Korea, p. 1014.
24. Spyrou V., Maurice H., Billinis C., Papanastassopoulos M, Psalla D., Nielen M., Koenen F., Papadopoulos O. (2004) Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats. *Vet. Res.* 35: 113-122.
25. Tesh, R.B. (1978). The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among human populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 144-149.
26. Vanderhallen, H. and Koenen, F. (1997). Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 66: 83-89
27. 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.