

Brote de encefalomiелitis hemaglutinante porcina por coronavirus en la República Argentina. Estudios anatomopatológicos, virológicos, moleculares y serológicos.

Quiroga, M.A.¹; Cappuccio, J.¹; Piñeyro, P.¹; Basso, W.¹; Moré, G.¹; Kienast, M.¹; Machuca, M.¹; Schonfeld, S.²; Cáncer, J.L.²; Arauz, S.¹; Pintos, M.E.¹; Nanni, M.³; Hirano, N.⁴; y Perfumo C.J.¹

1. Cátedra de Patología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata (UNLP), CC 296 1900AVW, La Plata, Bs. As., Argentina. mquiroga@fcv.unlp.edu.ar

2. Práctica Privada.

3. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (CICV), INTA cautelar.

4. Department Veterinary Microbiology, Iwate University, Morioka, Japón.

Parte de los resultados de este trabajo fueron previamente presentados en congresos nacionales y regionales (ver bibliografía). No existe conflicto de intereses por parte de los autores.

Palabras clave: Encefalomiелitis hemaglutinante porcina por coronavirus, epidemiología, patología, RT-PCR, inmunofluorescencia indirecta.

Keywords: Porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus, epidemiology, pathology, RT-PCR, indirect immunofluorescens test.

RESUMEN

Se describe un brote en lechones lactantes caracterizado por vómitos, signos nerviosos, emaciación y alta mortalidad producida por el coronavirus de la encefalomiелitis hemaglutinante del cerdo (PHE-CoV). Se realizó la confirmación diagnóstica por medio de estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos (IHQ) y de biología molecular (RT-PCR y secuenciación de los amplicones). Los hallazgos más salientes fueron: encefalitis o meningoencefalomiелitis no supurativa y ganglioneuritis, presencia de manguitos perivasculares con degeneración neuronal de los plexos de Meissner y Auerbach en la región pilórica del estómago. Mediante IHQ se observó inmunomarcación en el citoplasma de las neuronas del tallo cerebral y del ganglio trigémino. Mediante RT-PCR de muestras de tejido nervioso IHQ positivas se visualizó un producto de igual pb que el primer de pancoronavirus utilizado. La secuenciación del amplicón se correspondió en un 95% con las secuencias reportadas de la cepa VW572 de PHE-CoV (GenBank). Se realizó un estudio epidemiológico preliminar mediante la prueba serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en 9 granjas. Sobre el total de las granjas estudiadas 6 fueron positivas; siendo la granja motivo del trabajo, la única que manifestó entidad clínica. Estos resultados preliminares indican la presencia de una infección endémica por PHE-CoV en la República Argentina, en la mayoría de los casos en forma subclínica. Este trabajo constituye la primera comunicación de un brote de PHE-CoV en la Argentina y en Sudamérica, considerándosela como una enfermedad emergente.

SUMMARY

Outbreak of Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in pigs in Argentina. Pathological, virological, molecular and serological study.

An outbreak of vomiting, wasting and nervous signs in piglets less than 3 weeks old caused by porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus (PHE-CoV) infection is described. The etiological diagnosis was made by histopathology, immunohistochemistry (IHC), RT-PCR and genomic sequence (GS) studies. Non-suppurative encephalomyelitis or meningoencephalomyelitis, ganglioneuritis and perivascular cuffing with neuronal degeneration on intramural plexus of stomach were the main changes. By IHC, PHE-CoV was detected in neurons of the brainstem and in the trigeminal ganglion which correlates with the RT-PCR products detected in the same samples. Sequence analysis of PCR amplicons showed 95% correspondence with the WW572 strain of PHE-CoV virus from GenBank reference. A preliminary epidemiological study was performed by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) in 9 farms. Results of serological survey to detect antibodies against PHE-CoV by IFAT showed 6 positive farms. However, only the farm under study reported clinical signs. These preliminary results showed that PHE-CoV infection is widespread in Argentina in subclinical form, however new outbreaks might occur particularly in naive farms. The above results confirmed PHE-CoV infection as newly recognized emerging disease of pigs in Argentina and South America.

Introducción

La encefalomiелitis hemaglutinante porcina (PHE - sigla en inglés -) es una enfermedad infecciosa auto-limitante que afecta principalmente a cerdos lactantes⁵. Es causada por una variedad de coronavirus (CoV) que tiene al cerdo como su hos-

pedador natural, siendo el único coronavirus neurotrópico conocido en esta especie^{7,13}. El PHE-CoV es un virus ARN, caracterizado por presentar 2 hemoaglutininas asociadas al virión, la hemaglutinina-esterasa y la proteína S, que le permiten aglutinar espontáneamente eritrocitos de ratón, rata, pollo y otras especies.

El PHE-CoV fue aislado por primera vez en Canadá en 1962 del cerebro de lechones lactantes con encefalomiелitis⁶ y, más tarde, en Inglaterra de lechones lactantes que presentaron un cuadro de vómitos, anorexia y depresión ("vomiting and wasting disease"-VAWD)³. Ambas presentaciones clínicas (neurológica y VAWD)

se reprodujeron experimentalmente en cerdos a partir de una cepa de campo¹⁰. La infección ha sido descrita en Europa, Asia y Norteamérica, donde parece ser endémica y subclínica. Sin embargo, en establecimientos con reproductoras no inmunes, la infección por PHE-CoV da lugar al desarrollo de un síndrome clínico agudo que puede ocasionar una mortalidad del 100% en lechones, de menos de 3 semanas¹³. Estudios serológicos realizados en EE.UU. indican que la prevalencia varía del 0 al 89%, en Canadá e Inglaterra 49%^{7,9}, 76% en Alemania y en Japón entre 52 y 82%^{8,13}. En América Central y Sudamérica no existen reportes de la infección. El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en la correlación de los datos epidemiológicos (que incluyen historia clínica, signos, edad de los animales afectados y curso de la infección) con los hallazgos histopatológicos. El diagnóstico definitivo se obtiene por el aislamiento del PHE-CoV en la fase aguda de la infección. En la actualidad, los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) y moleculares (RT-PCR) permiten la detección

del PHE-CoV en los tejidos afectados^{4,11,14,16} y su diagnóstico definitivo. Los objetivos de este trabajo fueron describir las características epidemiológicas y clínicas así como los resultados de los estudios histopatológicos, virológicos, de biología molecular y serológicos de un cuadro de PHE-CoV.

Descripción de un caso

Historia clínica: el problema se presentó en una granja de 3 sitios de un total de 6000 madres. Al momento del brote el plantel reproductor se encontraba conformado por un 55% de hembras nulíparas y de primera y segunda parición. El sitio 1 estaba constituido por 20 galpones de gestación y 19 salas de maternidad. El sitio 2 (destete), por 9 galpones de 3000 animales cada uno y el sitio 3 (crecimiento y engorde) se encontraba conformado por 14 galpones, cada uno con capacidad para 1500 animales. El cuadro se inició el 8 de agosto y finalizó el 23 de agosto de 2006, afectando principalmente al sitio 1 y secundariamente al sitio 2. De las 19

salas de maternidad, 10 presentaron un porcentaje de mortalidad del 16,9% (1226 lechones) estimándose que el 12,6% de las muertes (913 animales) fueron compatibles clínicamente con infección por PHE-CoV. Los signos clínicos se observaron en lechones a partir de los 4 días de edad y consistieron en vómitos y signos nerviosos tales como somnolencia, posturas anormales, temblores, nistagmus y trastornos de la locomoción, acompañados de marcado desmedro (Figura 1). El vómito y la emaciación se presentaron en el 27,6% de los lechones \leq 1 semana, declinando gradualmente, hasta afectar al 1,6% de los cerdos de 3 semanas de edad (promedio: 13,6%). Los cerdos destetados del sitio 1 (incluidos los emaciados) fueron llevados al sitio 2. Allí, el 29% presentó, además de vómitos, marcada depresión, hipotermia, anorexia, deshidratación y muerte. El porcentaje de mortalidad varió entre el 15 y el 40% según la sala. En ambos sitios 3.683 lechones murieron o fueron sacrificados por razones humanitarias a lo largo de las 3 semanas que duró el cuadro.

Figura 1. Lechones lactantes con signos clínicos compatibles con encefalomielitis hemaglutinante porcina por coronavirus (PHE.CoV). También se observan algunos animales de la misma edad no afectados.



Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos (IHQ):

Se realizó la necropsia de 16 animales de entre 2 y 11 días de edad con signos nerviosos y desmedro (grupo 1-agudo). Se obtuvieron muestras para histopatología del tallo cerebral, médula oblonga, ganglios trigéminos, tonsilas, área pilórica del estómago, yeyuno, íleon, linfonódulos, corazón, bazo, hígado, riñón y pulmón. Dos semanas posteriores al inicio del cuadro clínico se sacrificaron 35 animales sobrevivientes de entre 25 y 47 días de edad, con un peso promedio de 2,6 kg, de los que también se colectaron muestras para estudio histopatológico (grupo 2-crónico). Para el estudio IHQ se utilizaron cortes del tallo cerebral procedentes de 5 animales con lesiones microscópicas de encefalitis no supurativa. Se utilizó, como suero primario, un suero murino anti PHE-CoV-67N y como sistema de detección el kit de LSAB2 (DakoCytomation, Ca, USA).

Estudios moleculares (técnica de RT-PCR):

Muestras procesadas: sólo se trabajó con material de 7 cerebros de lechones de 6 a 11 días que presentaron lesiones histopatológicas de encefalitis e IHQ positiva. Las muestras se conservaron a -70° C. Por otro lado, se obtuvo una muestra a partir de un cultivo de células PK 15 inoculado con pool de órganos de un lechón enfermo (cerebro, tonsilas, pulmón) (5° pasaje ciego).

Aislamiento de ARN: Se aisló ARN total a partir de 30 mg de las muestras de cerebro y de 30 µl de la suspensión del cultivo celular utilizando un kit comercial (RNeasy QIAGEN, GmbH, Hilden Alemania). Se siguieron las instrucciones del fabricante. El paso de homogeneización y lisis se realizó con jeringas de 5 ml y agujas 25/8.

Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):

Se utilizaron los oligonucleótidos (DNA) Cor FW y Cor RV que amplifican un fragmento de 251 pb, del gen de la polimerasa de pancoronavirus¹¹. Como control negativo se usó agua libre de RNAasas y master mix. La reacción se realizó en un volumen de 50 µl conteniendo 2 µl de la solución de ARN aislado, 10 µl de buffer 5x QIAGEN One-Step RT-PCR, 2 µl de mezcla de dNTPs (400 µM de cada dNTP), 1,8 µl de mezcla de enzimas (transcriptasas reversas y HotStart Taq® DNA polimerasa de QIAGEN One-Step RT-PCR,) 4 µM de cada oligonucleótido y agua libre de RNAasas c.s.p. 50 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PCR Sprint Thermo Electron Corp.) con un paso inicial de transcripción reversa a 50° C durante 30', seguido por una activación a 95° C por 15' y 40 ciclos de amplificación de (30 seg. a 95° C, 30 seg. a 50° C y 1 min. a 72° C) y una extensión final a 72° C durante 10 min.

El producto de amplificación se purificó con el kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen) y se secuenció utilizando un secuenciador de ADN Mega-Base 1000 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). La secuencia obtenida se analizó utilizando NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Estudios virológicos: se obtuvieron cinco homogenatos a partir del cerebro y tonsilas de lechones de entre 1 y 9 días de edad, que manifestaron cuadro clínico. Alícuotas de estas muestras se inocularon en las líneas celulares porcinas PK15 y SK-K y también en ratones lactantes (vía intracerebral). Los cultivos celulares se examinaron diariamente a fin de detectar efecto citopático y hemo-aglutinación. A los ratones se los controló por 7 días para la observación de signos nerviosos o muerte.

Estudio serológico

Se realizó en 9 granjas porcinas comerciales, incluyendo aquella en la que se presentó el cuadro clínico. El resto de las granjas no registraban historia clínica de PHE-CoV. En cada granja se obtuvieron 10 muestras de sangre de animales de engorde (22 semanas) y de hembras de más de 1 parto. Las muestras de los animales de 22 semanas provenientes de la granja que presentó el cuadro clínico se obtuvieron un mes antes del brote. El resto de las muestras se colectaron meses antes de la presentación del cuadro con otros fines. Se evaluó la presencia de anticuerpos anti-PHE-CoV por la técnica de inmunofluorescencia indirecta¹⁵.

Resultados

En el grupo 1-agudo sólo se consignó, a la observación macroscópica, pérdida de masa corporal y estómago vacío y distendido. El diagnóstico histopatológico fue de encefalomiелitis o meningoencefalomiелitis no supurativa caracterizada por infiltrado perivascular de células mononucleares, degeneración y necrosis neuronal, satelitosis y gliosis focal (Figura 2). En el ganglio trigémino se observó ganglioneuritis con algunas neuronas retraídas y fuertemente coloreadas rodeadas de células inflamatorias. En la capa muscular del estómago se observaron manguitos perivasculares con degeneración de las neuronas ganglionares (plexos de Meissner y Auerbach). En el grupo 2-crónico, los hallazgos de necropsia consistieron en: distensión del estómago (37,2%), neumonía (14,3%) y sin lesiones (48,5%). Microscópicamente sólo se consignaron manguitos perivasculares en la capa muscular del estómago y degeneración neuronal en el tallo cerebral.

Figura 2. Tallo cerebral (lechones con PHE-CoV): satelitosis (flechas) y gliosis. H & E. Obj. 40x

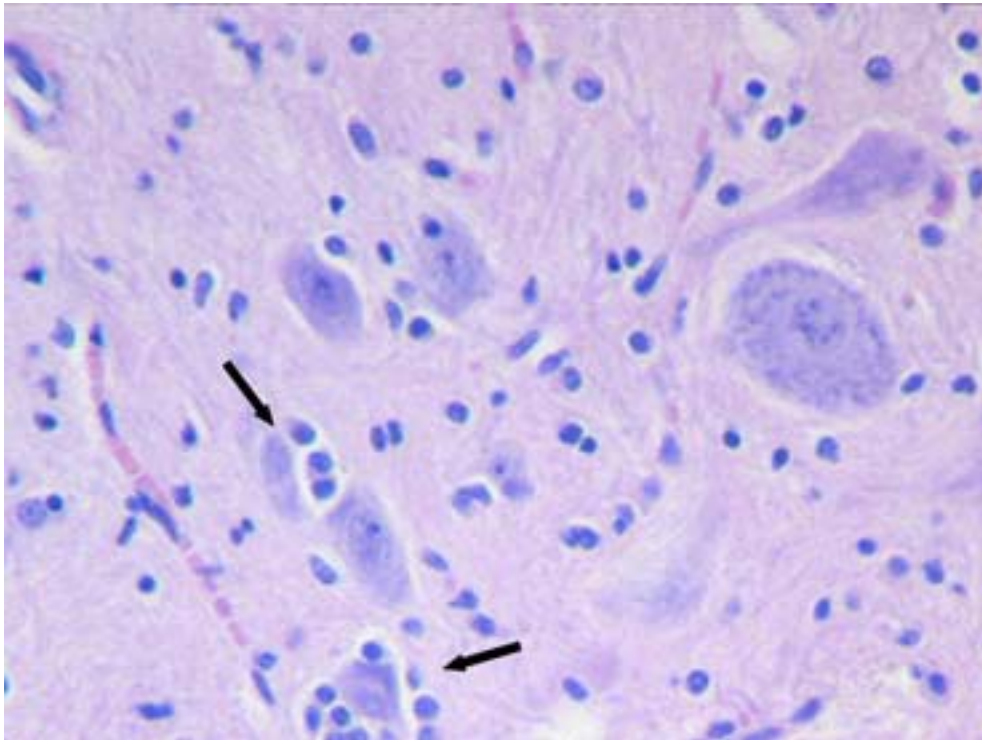
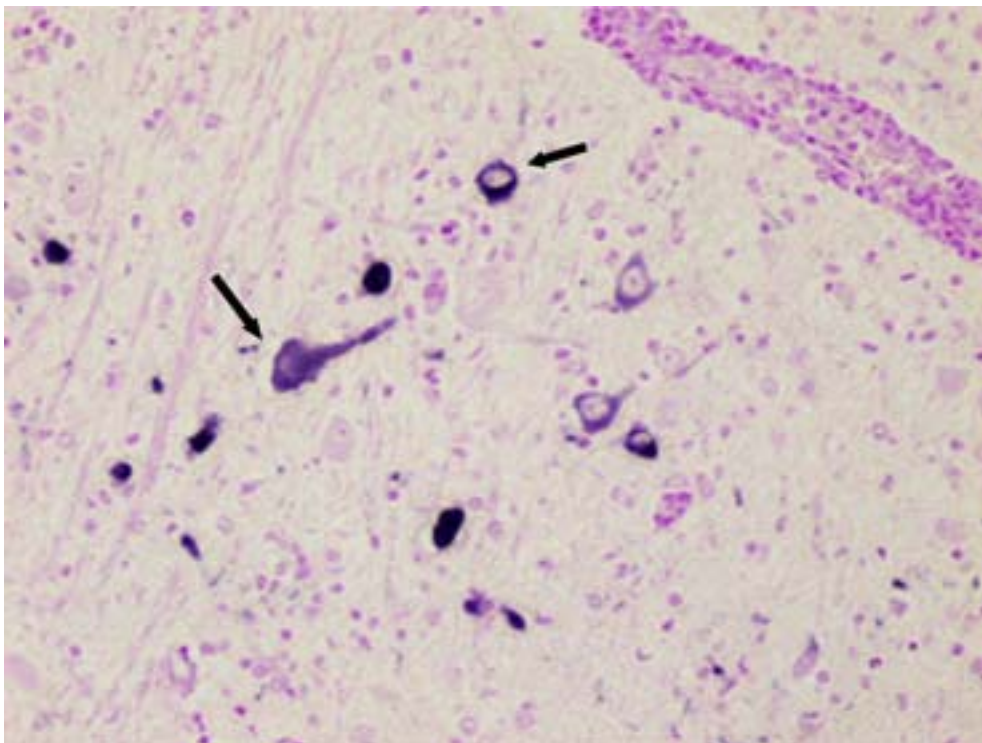


Figura 3. Neuronas del tallo cerebral (lechones con PHE-CoV): Inmunomarcación positiva en pericarion neuronal. Tinción inmunohistoquímica (LSAB 2). Obj. 20x.



Mediante la técnica de IHQ se observó inmunomarcación en el citoplasma de las neuronas del tallo cerebral y del ganglio trigémino en los lechones del grupo 1-agudo (Figura 3), resultando negativas las células de la neuroglía y las células nerviosas de los plexos de Meissner y Auerbach.

Los estudios virológicos arrojaron resultados negativos, no observándose efecto citopático ni hemoaglutinación o muerte de los ratones lactantes.

Mediante el estudio molecular (RT-PCR) se visualizó un producto de

amplificado de, aproximadamente, 250 pb a partir de todas las muestras de cerebro analizadas. En las muestras del control negativo y cultivo de células PK 15 no se observó ningún producto de amplificación.

Mediante la secuenciación de los amplicones se obtuvo una secuencia consenso de 116 pb que se reportó al GenBank (Número de acceso EF602436). Este fragmento se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (análisis BLAST) y reveló un 95% de homología con las secuencias repor-

tadas de la cepa VW572 de PHE-CoV (DQ 011855) y del gen de la polimerasa de PHE-CoV (AF 124988). Los resultados histopatológicos de IHQ y de RT-PCR correspondientes a las muestras del grupo 1-agudo se resumen en la tabla 1.

_Estudio serológico: sobre un total de 9 granjas, 6 fueron positivas (66,6%). En éstas se detectaron anticuerpos en las dos categorías de animales muestreados. Los porcentajes de animales positivos observados en cada granja se presentan en la tabla 2.

Tabla 1. Resultados histopatológicos, IHQ y de RT-PCR en muestras del grupo 1-agudo

| Organos | Edad y días con signos clínicos () | IHQ | RT-PCR | Diagnóstico histopatológico |
|-------------------|-------------------------------------|-----|--------|-------------------------------------|
| Tallo cerebral | 6 (2) | + | + | Encefalitis no supurativa |
| Tallo cerebral | 8 (4) | + | + | Encefalitis no supurativa |
| Ganglio trigémino | 8 (4) | + | + | Ganglioneuritis focal no supurativa |
| Médula oblonga | 11(6) | + | + | Meningoencefalitis no supurativa |

Tabla 2. Resultados de la prueba de IFI en muestras de cerdos de engorde y madres.

| Granja | Engorde ¹ | Hembras ¹ |
|----------------|----------------------|----------------------|
| 1 | Negativa | Negativa |
| 2 | 30% (3/10) | 20% (2/10) |
| 3 | 40% (4/10) | 40% (4/10) |
| 4 | Negativa | Negativa |
| 5 | Negativa | Negativa |
| 6 | 50% (5/10) | 57% (4/7) |
| 7 | 50% (5/10) | 30% (3/10) |
| 8 ² | 70% (7/10) | 50% (5/10) |
| 9 | 70% (7/10) | 42,8% (3/7) |
| Total | 34,4% (31/90) | 25% (21/84) |

1. Resultados expresados en porcentaje de animales positivos.

2. Granja con presentación clínica.

Discusión

Desde un punto de vista epidemiológico el curso de la enfermedad (3 semanas), la edad de los animales afectados (< 3 semanas) y los signos clínicos correspondieron a los descritos para PHE-CoV^{10,13,17}. La severidad de los signos clínicos, tales como vómitos y emaciación, así como la mortalidad, fueron mayores que las descritas para este síndrome por otros autores^{1,13}. El alto porcentaje de hembras jóvenes (núlparas y primíparas), posiblemente no inmunes, así como el frío (invierno) son considerados factores de riesgo. Los lechones sólo son susceptibles hasta las 3 semanas de vida, período durante el cual con un adecuado escalonamiento de la edad reproductiva del pie de cría resultarían protegidos por los anticuerpos maternos^{1,10,13}. Esto explicaría por qué sólo en 10 de las 19 salas de maternidad se observaron signos clínicos.

La ausencia de lesiones macroscópicas, a excepción de la pérdida de masa corporal y distensión del estómago, es común a ambas presentaciones clínicas (encefalomielitis y VAWD)^{3,6}. Las lesiones descritas en estómago y en ganglio trigémino se observaron en lechones de 2 días de edad, sin signos clínicos y sólo se describen en cerdos con VAWD 13. La presencia de encefalo-

mielitis no supurativa se ha consignado en el 70 -100% de los casos con signos nerviosos y en el 20 -60% con el síndrome VAWD¹³. En nuestro estudio se la constató en el 50% de los animales del grupo 1-agudo. Los resultados del estudio IHQ se correspondieron a lo descrito por otros autores, donde sólo las neuronas presentan inmunomarcación^{2, 12, 13}. Tanto los resultados de RT-PCR, realizados a partir de tejidos nerviosos con IHQ positiva, como la secuenciación de los amplicones permitieron identificar al virus actuante como PHE-CoV.

El aislamiento de PHE-CoV es difícil, requiere de muestras obtenidas en el período agudo de la infección, alto título en tejidos, líneas celulares susceptibles y conocimiento de los requerimientos/inhibidores de los medios de cultivos y su manipulación. Algunos de estos aspectos incidieron en los resultados negativos obtenidos hasta el presente.

Los resultados serológicos preliminares¹⁵ revelan la existencia de una infección endémica por PHE-CoV en la Argentina, hasta ahora desconocida en Sudamérica. Además, estos resultados evidencian que el 66,6% de las granjas estudiadas han estado o están en contacto con el virus en forma subclínica, teniendo en cuenta que de ellas, sólo una reportó entidad clínica. Lo descrito se corresponde con los resultados pre-

sentados en la bibliografía^{7,8,9,13} e indica que la manifestación clínica de la infección sólo ocurre en granjas con infección subclínica, cuando existe alguna falla en la aclimatación de las núlparas, presencia de subpoblaciones no inmunes, ausencia/reducción de anticuerpos calostrales y progenie susceptible^{10,13}. La presencia de anticuerpos en cerdos de engorde pertenecientes a la granja con cuadro clínico, previo al brote, muestra que la infección era endémica y subclínica en el establecimiento y que no se debió a una falla en la bioseguridad externa. Por otro lado, la existencia de granjas libres de anticuerpos señala la necesidad de extremar medidas de bioseguridad al ingreso, asegurando una adecuada cuarentena y aclimatación ya que son susceptibles de presentar cuadros con alta morbimortalidad.

Conclusiones

El presente trabajo constituye la primera comunicación de un brote de encefalomielitis hemaglutinante porcina por CoV como enfermedad emergente en la Argentina y en América del Sur. Su confirmación se realizó mediante estudios histopatológicos, IHQ, RT-PCR y secuenciación. El carácter endémico de la infección se determinó mediante la prueba de IFI.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con la financiación de Subsidio PICT 2005-33987, ANPyCT, FONCyT y subsidio otorgado por la U.N.L.P. en el marco del Programa de Incentivos a los Docentes Investigadores de la U.N.L.P.

Bibliografía.

1. **Alsop, J.E.** A presumptive case of vomiting and wasting disease in a swine nucleus herd. SHAP 2006; 14: 97-100.
2. **Andreis, K. y Pensaert, M.B.** Immunofluorescence studies on the pathogenesis of hemagglutinating encephalomyelitis virus in pigs after oronasal inoculation. Am J Vet Res 1980, 41: 1372-1378.
3. **Cartwright, S.F.; Lucas, M.; Cavill, J.P.; Gush, A.F. y Blandford, T.B.** Vomiting and wasting disease of piglets. Vet Rec 1969, 84: 175-176.
4. **Basso, W.; Moré, G.; Kienast, M.; Cappucio, J.; Quiroga, M.A.; Piñeyro, P.** et al. Hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus infection in Argentina: RT-PCR and genomic sequence studies. En Memorias: XIII ABRAVES, 15-19 de Octubre de 2007, Florianópolis, SC, Brasil.
5. **Chang, G.N.; Chang, T.C.; Lin, S.C.; Tsai, S.S. y Chern, R.S.** Isolation and identification of hemagglutinating encephalomyelitis virus form pigs in Taiwan. J Chin Soc Vet Sci 1993; 19: 147-158.
6. **Greig, A.S.; Mitchell, D.; Corner, A.H.; Bannister, G.L.; Meads, E.B. y Julian, R.J.** A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. Can J Comp Med 1962; 26: 49-56.
7. **Greig, A.S y Girard, A.** Serological comparison of hemagglutinating encephalomyelitis viruses isolated from different outbreaks. Can J Comp Med 1969; 33: 25-28.
8. **Hirano, N.; Suzuki, Y. y Haga S.** Pigs with highly prevalent antibodies to human coronavirus and swine haemagglutinating encephalomyelitis virus in the Tohoku District of Japan. Epidemiol Infect 1999; 122: 545-551.
9. **Mengeling, W.L.** Incidence of antibodies for hemagglutinating encephalomyelitis virus in serums from swine in the United States. Am J Vet Res 1975; 36: 821-823.
10. **Mengeling, W.L. y Cutlip, R.C.** Pathogenicity of field isolates of hemagglutinating encephalomyelitis virus for neonatal pigs. Am Vet Med Assoc 1976; 168: 236-239.

11. **Moës, E.; Vijgen, L.; Keyaerts, E.; Zlateva, K.; Li, S.; Maes, P.; et al.** A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL 63 in children hospitalized with respiratory tract infection in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005; 5:6.
12. **Narita, M.; Kawamura, H.; Tsuboi, T.; Haritani, M. y Kobayashi, M.** Immunopathological and ultrastructural studies on the tonsils of gnotobiotic pigs infected with strain 67N of hemagglutinating encephalomyelitis virus. *J Comp Pathol* 1989; 100: 305-312.
13. **Pensaert, M.B.** Hemagglutinating encephalomyelitis virus. En: Straw B. L., Taylor D. J. ed. *Diseases of Swine*. Blackwell Publishers. Iowa, EE.UU., 2006; p. 353-358.
14. **Quiroga, M.A.; Cappuccio, J.; Piñeyro, P.; Machuca, M.; Hirano, N. y Perfumo, C.J.** Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de un brote de encefalomiélitis hemoaglutinante porcina producida por coronavirus en la República Argentina. En: *Memorias XIII ENAPAVE*, Julio 2007, Campo Grande, M.G.S., Brasil.
15. **Quiroga, M.A.; Machuca, M.; Cappuccio, J.; Piñeyro, P.; Hirano, N. y Perfumo C.** Serological survey of porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus antibodies in Argentinean farms. En: *Memorias XIII ABRAVES*, 15-19 de Octubre de 2007, Florianópolis, SC, Brasil.
16. **Sasseville, A.M.J.; Gelidas, A.M.; Sawyer, S.; Boutin, M.; Boutin, S. y Dea, S.** Biological and molecular characteristic of an HEV isolate associated with recent acute outbreak of encephalomyelitis in Quebec pig farms. *Adv Exp Med Biol* 2001; 494: 57-62.
17. **Werdin, R.E.; Sorensen, D.K. y Stewart, W.C.** Porcine encephalomyelitis caused by hemagglutinating encephalomyelitis virus. *Am Vet Med Assoc* 1976; 168: 240-246.