

## Poglavje 11

# Spremljanje genetske raznolikosti virusov PRRS v Sloveniji: možnosti in pomen za rejce prašičev

Ivan Toplak<sup>1,2</sup>, Marina Štukelj<sup>1</sup>

### Izveček

V letih od 2009 do 2012 smo genetsko tipizirali skupno 178 virusov PRRS, ki smo jih ugotovili v pozitivnih vzorcih z metodo RT-PCR. S primerjavo virusov iz 91 okuženih rej prašičev smo v številnih rejah ugotovili genetsko zelo sorodne viruse, iz česar lahko sklepamo, da gre za aktivni prenos virusov med temi okuženimi rejami znotraj Slovenije. 171 tipiziranih virusov PRRS iz 87 rej smo uvrstili v eno od ugotovljenih 15 genetskih podskupin genotipa 1 z 83.3-100.0 % medsebojno identičnostjo nukleotidov. Velika genetska raznolikost potrjuje vnos virusov PRRS v slovenske reje iz večjega števila različnih virov (okuženih rej), zelo verjetno iz večjega števila držav. V oktobru leta 2012 smo v treh rejah prvič ugotovili divje seve virusa PRRS, ki spadajo v genotip 2. Vnos genetsko novih virusov PRRS bo v prihodnjih letih povzročali še dodatne težave.

Ključne besede: prašiči, virus PRRS, tipizacija, epidemiologija

### Abstract

Title of the paper: **Monitoring of genetic diversity of PRRS viruses in Slovenia: possibilities and importance for pig farmers.** In the years from 2009 to 2012, altogether 178 PRRS viruses were genetically typed after samples have been identified as positive by the RT-PCR method. The comparison of PRRS viruses from 91 infected pig herds showed genetically very similar viruses in many farms. We can conclude that there is active transmission of viruses between infected herds in Slovenia. The 171 PRRS viruses from 87 individual pig herds were assigned to one of 15 identified genetic subgroups of genotype 1 with 83.3 to 100.0% nucleotide identity between them. High genetic diversity of PRRS viruses confirms the introduction of viruses in Slovenian pig herds from numerous sources (infected herds), probably from many countries. In October 2012, wild strains of PRRS virus, which belong to genotype 2, were newly detected in 3 pig herds. This new introduction of genetically different PRRS viruses is expected to generate additional problems in the following years.

Key words: pigs, PRRS virus, typing, epidemiology

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>E-pošta: ivan.toplak@vf.uni-lj.si

## 11.1 Uvod

Prašičji reprodukcijski in respiratorni sindrom (PRRS) je virusna bolezen prašičev, ki povzroča velike ekonomske škode v okuženih prašičjih rejah. PRRS je bolezen, ki je po svetu razširjena v skoraj vseh državah, kjer redijo prašiče. Prvič so jo diagnosticirali v Združenih državah Amerike leta 1987, leta 1988 v Kanadi, v Evropi pa se je najprej pojavila v Nemčiji leta 1990, leta 1991 pa so jo ugotovili na Nizozemskem, Španiji, Belgiji in Angliji (Wensvoort in sod., 1991), kasneje pa v večini evropskih držav. Najpogostejši način vnosa virusa PRRS v neokuženo rejo je z nakupom živih okuženih prašičev. Okuženi prašiči lahko širijo virus s slino, z nosnim izcedkom, z urinom, s semenom in z blatom. Breje svinje, ki se okužijo v pozni brejosti izločajo virus preko mleka. Znan pa je tudi prenos virusa, transplacentarno (zlasti v zadnji tretjini brejosti) iz okužene breje svinje na zarodke. Posledično okužba privede do smrti zarodkov, abortusov ali prasitev okuženih in slabotnih pujskov.

Virusi PRRS so različno virulentni, kar se odraža v različni intenzivnosti kliničnih znakov po vnosu virusa v rejo. Pri svinjah se že v 24. - 36. urah po okužbi pojavi neješčnost, ki lahko traja do 4 dni pri posamezni živali oziroma 7-10 dni v čredi. Svinje so apatične, težko dihaajo, pojavi se povišana telesna temperatura, ki redko preseže 40°C ter navadno traja le en dan, opazimo številčnejše pregonitve. Abortusi se lahko pojavijo že 22. dan brejosti, večina abortusov pa je zabeleženih v drugem obdobju brejosti. Rejci, po okužbi reje, prve probleme opazijo pri prasiatvah, saj se zelo poveča število mrtvorojenih pujskov zaradi prezgodnjih prasitev in poveča se število poginov pujskov v prvem tednu starosti, nekateri pujski so slabotni, vendar pa lahko v gnezdu najdemo tudi povsem normalno razvite pujske. V okuženih gnezdh se poveča incidenca razkrečenih pujskov.

Pri odstavljenih in pitancih se poveča število respiratornih obolenj in sprememb na koži, ki so vidne peti do sedmi dan po okužbi (Taylor, 2006). S starostjo pujskov se klinični znaki bolezni omilijo in pri pitancih virus v večini primerov ne povzroča večjih težav. Pri merjascih opazimo padec v kvaliteti semena in lahko opazimo pojav modrih uhljev. V okuženi reji se poslabša splošno zdravstveno stanje živali, pojavi pa se tudi klinična slika obolenj prisotnih drugih endemičnih bolezni, ki pa so bile pred okužbo z virusom PRRS nezaznavne. V prvih osmih tednih po okužbi (prvo obdobje) se lahko pojavi povišana predodstavitvena mortaliteta (okoli 33 %), dvigne se število mrtvorojenih (za okoli 18 %).

V drugem obdobju, ki traja približno 6 tednov, se še vedno ugotavlja enako število mumificiranih pujskov, teža živorojenih pujskov pa se zniža. Za približno 18 % se poviša število pregonitev. V tretjem obdobju se zmanjša število prasitev in poviša število pregonitev. Po 26. tednih lahko zaradi pridobljene imunosti v plemenski čredi pričakujemo izboljšanje stanja v reji, vendar v večini primerov ne pride do samoozdravitve okuženih rej, brez izvedenih dodatnih ukrepov, saj se virus pri posameznih živalih ohranja dolgo obdobje in vedno znova prenaša na novorojene živali in starejše živali, ki se vedno znova okužujejo. Tako bolezen postopoma preide v kronično obliko in se klinični znaki pojavljajo pri živalih, ki so občutljive na okužbo (še ne okužene živali in živali, ki so prebolele okužbo, vendar nimajo zaščitnih protiteles), na ta način beležimo izboljšanje in slabšanje stanja v reji (Taylor, 2006). Seveda

pa se lahko stanje akutne okužbe znova ponovi, če se reja okuži z drugim sevom (različnim od prvotnega) virusa.

Ugotovljena velika genetska raznolikost virusov PRRS po svetu in v Evropi je ena od ključnih značilnosti te bolezni, ki zelo otežuje nadzor in zdravljenje bolezni. Poznana sta dva genotipa virusov PRRS in sicer genotip 1 (pretežno so virusi genotipa 1 razširjeni v Evropi) in genotip 2 (pretežno razširjeni v Ameriki in Aziji). V Evropi ugotavljamo 72,2 - 90,0 % sorodnost med virusi PRRS genotipa 1, ki so jih tipizirali na Danskem, Italiji, Češki, Poljski, Španiji, Nemčiji, na Nizozemskem, Madžarskem, Belorusiji in Sloveniji (Oleksiewicz in sod., 2000; Stadejek in sod., 2002; Mateu in sod., 2002; Pesch in sod., 2005; Indik in sod., 2005; Stadejek in sod., 2006; Balka in sod., 2008; Toplak in sod., 2012).

V Sloveniji smo protitelesa proti PRRS prvič ugotovili pri prašičih v karantenskem hlevu leta 1994 (Valenčak, 2004). Zaradi kontrole gibanja prašičev in sorazmerno strogi zakonodaji (obvezne karantene) se bolezen pred vstopom v Evropsko unijo v naših rejah ni pojavljala. Predvidevamo pa, da so se prvi vnosi virusa PRRS začeli takoj po letu 2004 z vstopom v EU. S tem smo stopili na evropski trg, kjer je prisotno prosto trgovanje s prašiči znotraj EU in znotraj Slovenije. Uvoz prašičev ali semena iz drugih držav, brez laboratorijskih pregledov na PRRS, je imelo za posledico nekontrolirano širjenje virusa, v do tedaj še neokužene reje. Virus PRRS smo v Sloveniji prvič uradno dokazali v letu 2009, serološko pozitivne živali pa že nekaj let prej (Toplak in sod., 2010).

Rejci in veterinarji so ob vnosu virusa PRRS v številne reje v Sloveniji opažali spremembe v zdravstvenem stanju pri prašičjih različnih kategorij, vendar je pomanjkanje izkušenj z ukrepanjem proti bolezni in zaradi kompleksnosti bolezni same, prihajalo le do posameznih poskusov zdravljenja okuženih rej. Poskusi ukrepanja zoper okužbe z virusom PRRS v posameznih rejah in pogajanja o nacionalnem programu kontrole in izkoreninjenja PRRS, bistvenega napredka v preteklih letih niso prinesli zaradi nezainteresiranosti in zaradi individualnih pristopov k ukrepanju. Glede na sorazmerno gosto naseljenost rej prašičev, zlasti v vzhodni Sloveniji, bi bil nujen regijski pristop k ukrepanju zoper PRRS.

Molekularno-epidemiološke študije nam omogočajo vpogled v genetsko raznolikost virusov PRRS ugotovljenih v okuženih rejah prašičev. Opravljene študije so pokazale veliko genetsko različnost med sevi virusov PRRS ugotovljenimi po številnih rejah v Sloveniji, kar potrjuje vnos virusa iz velikega števila različnih virov (Toplak in sod., 2010).

## 11.2 Material in metode

Izhodišča za spremljanje genetske raznolikosti virusov PRRS smo postavili na več posameznih sklopov, da bi zbrali potrebne podatke za ocenitev dejanskega števila različnih virusov PRRS, ki krožijo v slovenskih rejah od leta 2009 naprej. Potrditev PRRS virusa (ali virusne nukleinske kisline) v preiskanem vzorcu, nam dokazuje neposredno prisotnost povzročitelja v reji iz katere je bil vzorec pri posamezni ali več živalih odvzet. Vzorčenje smo izvajali v rejah s klinično sliko bolezni, v rejah v katerih se pojavljajo abortusi, prasitev šibkih pujskov, pogin pujskov, motnje v reprodukciji, pogin plemenskih svinj, težave z dihanjem in

pogostejše ugotovitve pljučnic ter slabši proizvodni rezultati. Prav tako pa smo v študijo vključili pozitivne vzorce na virus PRRS, ki smo jih ugotovili pri poginjenih prašičih in za katere nimamo podatkov o klinični sliki bolezni v reji.

Vse ugotovljene pozitivne vzorce z virusom PRRS smo genetsko tipizirali tako, da smo jim določili nukleotidno zaporedje na kratkem odseku virusnega genoma PRRS pri posameznem pozitivnem vzorcu z metodo RT-PCR po postopku, ki so ga opisali Toplak in sod. (2012). S tem pristopom smo ugotovili razširjenost različnih tipov virusa PRRS v posameznih rejah.

### 11.3 Rezultati in razprava

V letih od 2009 do 2012 smo genetsko tipizirali skupno 178 virusov PRRS (tabela 1), ki smo jih ugotovili v pozitivnih vzorcih z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR). Pozitivni vzorci, ki smo jih tipizirali, izvirajo iz 91 različnih rej. Z metodo določanja nukleotidnega zaporedja in s primerjavo 258 nukleotidov na kratkem odseku regije ORF7 virusnega genoma, smo izvedli molekularno epidemiološko študijo na 178 virusih PRRS.

Z genetsko primerjavo virusov iz rej prašičev, ki so bile okužene z virusom PRRS, smo ugotovili genetsko zelo sorodne v številnih rejah, iz česar lahko zaključimo, da gre za aktiven prenos virusov med okuženimi rejami znotraj Slovenije. Pozitivne reje so geografsko razporejene na celotnem področju Slovenije, največje število pozitivnih rej pa se nahaja v severo-vzhodnem delu Slovenije (Štajerska in Pomurje), kjer je tudi največja gostota prašičev. 171 tipiziranih virusov PRRS iz 87 posameznih rej smo uvrstili v eno od ugotovljenih petnajstih genetskih podskupin genotipa 1 (a=6, b=19, c=1, d=2, e=96, f=11, g=2, h=11, i=3, j=7, k=1, m=6, n=3, o=2, p=1) z 83.3–100.0 % medsebojno identičnostjo nukleotidov.

Ugotovljena velika genetska raznolikost virusov PRRS potrjuje vnos virusov PRRS v slovenske reje iz večjega števila različnih okuženih virov (rej), po vsej verjetnosti iz večjega števila različnih držav. Izvedena tipizacija potrjuje sume, da se z uvozom živih plemenskih prašičev ali pitancev, pa tudi s semenom, ki ni pregledano na virus PRRS, virus PRRS pogosto vnaša v naše reje. Iz opravljene tipizacije opazimo, da so virusi iz genetske skupine 1e daleč najpogosteje ugotovljeni (96 pozitivnih vzorcev ugotovljenih v 46 različnih rejah), kar predstavlja 50.5 % okuženih rej.

Pri primerjavi dobljenih podatkov za viruse iz podskupine 1e, s podatki, ki so dostopni v genski banki podatkov (GenBank) za tipizirane viruse PRRS ugotavljamo, da gre za virusni sev, ki je le 92 % soroden najbližjemu sevu v genski banki, sevi ugotovljeni v Sloveniji pa se med seboj razlikujejo le do 4 %. Iz tega lahko sklepamo, da se ta sev virusa pred letom 2009 vnesel v Slovenijo iz neznanega vira, vse od leta 2009 naprej pa se zelo uspešno širi po Sloveniji, saj je polovica okuženih rej v Sloveniji posledica okužbe z istim sevom virusa PRRS.

Druga najpogostejša podskupina 1b (19 vzorcev) je bila ugotovljena v 15 različnih rejah, sledi podskupina 1f (11 vzorcev) ugotovljena v 8 rejah in podskupina 1h (11 vzorcev) ugotovljena v 5 različnih rejah. Ostale podskupine (a, c, d, g, i, j, k, m, n, o, p) ugotavljamo v

Tabela 1: Prikaz ugotovljenega števila pozitivnih vzorcev na virus PRRS s prikazom petnajstih podskupin virusov genotipa 1 in ene skupine genotipa 2 med leti 2009 in 2012

Genotip	Leto				Skupaj	%
	2009	2010	2011	2012		
1a	1	3	1	1	6	3.3
1b	2	4	6	7	19	10.6
1c	0	1	0	0	1	0.5
1d	0	2	0	0	2	1.1
1e	12	38	27	19	96	53.9
1f	2	5	3	1	11	6.1
1g	0	2	0	0	2	1.1
1h	1	1	4	5	11	6.1
1i	0	2	0	1	3	1.6
1j	0	0	4	3	7	3.9
1k	0	0	1	0	1	0.5
1m	0	0	5	1	6	3.3
1n	0	0	1	2	3	1.6
1o	0	0	0	2	2	1.1
1p	0	0	0	1	1	0.5
2	0	0	4	3	7	3.9
Skupaj	18	58	56	46	178	

manjšem številu rej ali v posameznih rejah. Če spremljamo različnih genetskih podskupin virusov PRRS od leta 2009 naprej ugotavljamo, da število ugotovljenih sevov različnih podskupin še vedno narašča, kar pomeni, da se bo stanje glede okužb z virusi PRRS v prihodnjih letih le še slabšalo (tabela 1). Z večjim številom različnih virusov, ki krožijo v slovenskih rejah bo namreč tudi nadzor bolezni še težavnejši, saj v rejah, ki so bile v preteklih letih okužene in rejah, ki so se pred kratkim okužile z virusom PRRS, ugotavljamo že predhodno ugotovljene virusne seve, pa tudi vedno nove viruse PRRS.

Ker se virus PRRS uspešno prenaša tudi s semenom pridobljenim od okuženih merjascev, ne gre zanemariti dejstva, da je okužba številnih rej v Sloveniji posledica vnosa virusa s semenom. Merjasci namreč niso pod redno kontrolo glede okužbe PRRS in posledično osemenitve z okuženim semenom prispevajo k širjenju okužbe. Prav tako pa je tvegana osemenitev z nepreverjenim semenom. V številnih rejah smo ugotovili istočasno okužbo z več kot enim sevom virusa PRRS, epidemiološka poizvedba v teh rejah pa je potrdila sume, da se v rejo pogosto vnašajo živali brez kontrole glede PRRS.

Rejci se pogosto poslužujejo cepljenja živali brez predhodnega ugotavljanja sorodnosti med hlevskim sevom in cepnim sevom, zaradi česar v večini primerov cepljenje ne daje zadovoljivih rezultatov. Zaradi genetske različnosti (ugotovljenih 15 podskupin genotipa 1) med

ugotovljenimi virusi je navzkrižna zaščita v večini primerov nezadostna, torej protitelesa pridobljena po okužbi proti enem sevu virusa ne ščitijo živali pred okužbo proti drugemu tipu virusa.

Posebej zaskrbljujoče je dejstvo, da smo v letu 2011 v petih rejah ugotovili viruse PRRS iz genotipa 2, skupaj s sočasno okužbo z virusi iz podskupin 1a, 1b in 1e. Ker so ugotovljeni virusi genotipa 2 genetsko zelo sorodni cepnemu virusu Amervac (99.5 % identičnost), gre po vsej verjetnosti za ugotovitev cepnega virusa genotipa 2. Zakaj smo pri živalih ugotovili cepni sev virusa, ki se uporablja za zaščito proti genotipu 2, ni bilo nikoli pojasnjeno.

V oktobru leta 2012 smo prvič ugotovili divje seve virusa PRRS v treh rejah, ki spadajo v genotip 2 in imajo s cepnim sevom Amervac le 94.4 - 98.5 % identičnost nukleotidov, s sevi genotipa 1 pa imajo le 60.9 - 65.0 % identičnosti. Te primerjave kažejo, da gre v letu 2012 za vnos genetsko novih virusov PRRS, ki bodo v prihodnjih letih povzročali še velike težave, saj gre za viruse iz genotipa 2, ki so bili v Evropi le redko ugotovljeni pred letom 2012.

Seveda pa naše ugotovitve temeljijo le na znanih podatkih, ki smo jih dobili s tipizacijo ugotovljenih pozitivnih vzorcev. Prav gotovo je število prisotnih sevov, ki krožijo v naših rejah, še veliko večje, vendar smo zaradi pomanjkanja finančnih sredstev za raziskave bili prisiljeni omejiti tudi število preiskav.

Rejci pa se le v redkih primerih odločajo za karanteno nakupljenih prašičev in za laboratorijsko testiranje vzorcev. Zaradi številnih genetskih skupin virusov PRRS, ki krožijo v Sloveniji in nespoštovanja osnovnih biovarnostnih ukrepov je vakcinacija proti PRRS z vakcinami, ki temeljijo na sevu Lelystad (genotip 1) v večini primerov neučinkovita, kar potrjujejo tudi poročila iz terena. Stanje se lahko izboljša smo s sistematičnim pristopom k ukrepanju proti PRRS, ki temelji na podeljevanju statusa pozitivnim in negativnim rejam. Za neokužene reje, ki so uspele ohraniti zdrave živali je bistvenega pomena pozornost (potrdila o zdravstvenem stanju, karantena) pri nabavi novih živali in uporabi preverjeno negativnega semena, saj bodo reje ohranili negativno le z vnosom negativnih živali na protitelesa in virus PRRS v svojo rejo.

#### 11.4 Zaključki

Spremljanje genetske raznolikosti virusov PRRS ugotovljenih med leti 2009 in 2012, v okuženih rejah v Sloveniji, je pokazalo prisotnost velikega števila genetsko različnih virusov PRRS, ki jih razvrščamo v 15 genetskih podskupin genotipa 1 in eno genetsko skupino genotipa 2. Virusi PRRS so se v tem obdobju širili med okuženimi rejami v Sloveniji, poleg tega pa se z nakupom zdravstveno nepreverjenih živih prašičev iz tujine povečuje vnos vedno novih sevov virusov PRRS. V večini primerov gre za posledico nakupa živih živali brez laboratorijskih pregledov glede okužbe na PRRS, rejci pa se očitno ne zavedajo, da nevede kupujejo okužene živali z virusom PRRS, ki kasneje v reji povzročajo številne probleme povezane z PRRS. Veliko nevarnost za še neokužene reje predstavlja vnos virusa PRRS s semenom, saj pri nas ni ustrezne zakonodaje, prav tako plemenski merjasci v večini primerov

niso pod nadzorom glede zdravstvenega statusa okužbe z virusom PRRS. Genetska tipizacija virusov PRRS je učinkovito orodje za dokazovanje prenosa virusa PRRS med rejami, prav tako pa lahko metodologijo uporabimo za dokazovanje vnosa novih virusov z uvozom prašičev. Genetska tipizacija je priporočljiva metoda tudi za ugotavljanje sorodnosti med hlevskim in cepnim sevom virusa, kadar želimo, da bo cepljenje proti virusu PRRS učinkovito. Razvita metodologija genetske tipizacije virusov PRRS je v zadnjih letih tako napredovala, da je postala pomemben del diagnostike PRRS in je cenovno dostopna ter uporabna tudi za rejce, ki želijo bolezen izkoreniniti iz okužene reje.

### 11.5 Viri

- Balka G., Hornyak A., Balint A., Kiss I., Kecskemeti S., Bakonyi T., Rusvai M. 2008. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet. Microbiol.*, 127: 128–135.
- Indik S., Schmoll F., Sipos W., Klein D. 2005. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnosis and viral quantification. *Vet. Microbiol.*, 107: 171–179.
- Mateu E., Martin M., Vidal D. 2002. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. *J. Gen. Virol.*, 84: 529–534.
- Oleksiewicz M.B., Botner A., Toft P., Grubbe T., Nielsen J., Kamstrup S., Storgaard T. 2000. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutations: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology*, 267: 135–140.
- Pesch S., Meyer C., Ohlinger V.F. 2005. New insight into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.*, 107: 31–48.
- Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Patapchuk D., Podgorska K. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.*, 87: 1835–1841.
- Stadejek T., Stankevicius A., Storgaard T., Oleksiewicz M.B., Belak S., Drew T.W., Pejsak Z. 2002. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.*, 83: 1861–1873.
- Taylor D.J. 2006. The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). V: Pig diseases, 8th edition, St Edmundsbury Press Ltd, Suffolk, UK: 60-68.
- Toplak I., Rihtarič D., Hostnik P., Grom J., Štukelj M., Valenčak Z. 2012. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in

- Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J. Virol. Methods*, 179: 51–56.
- Toplak I., Štukelj M., Zabavnik Piano J., Hostnik P., Grom J., Valenčak Z. 2010. Študija o pojavnosti prašičjega reproduktivnega in respiratornega sindroma (PRRS) v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana, Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut. 40 str. (tipkopolis).
- Valenčak Z. 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Slovenia: Evaluation of serology. *Slo. Vet. Res.*, 41: 99–101.
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., Ter Laak E.A., Bloemrad M., De Kluyver E.P., Kragten C., Van Buiten L., Den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J.M., Moonen P.L.J.M., Zetstra T., De Boer E.A., Tibben H.J., De Jong M.F., Van't Veld P., Groenland G.J.R., Van Gennep J.A., Voets M.T., Verheijden J.H.M., Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Leystadt virus. *Vet. Quart.*, 13: 121–130.