

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

豬第二型環狀病毒單獨感染及混合豬生殖與呼吸綜合症病毒感染對豬隻免疫細胞之影響及其可能之作用機制(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-141-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：龐飛

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：豬第二型環狀病毒單獨感染及混合豬生殖與呼吸綜合症病毒感染對豬隻免疫細胞之影響及其可能之作用機制(1/3)

Effects of porcine type II circovirus (PCV2) infection and co-infection of PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus the immunocytes of swine and its related mechanism.

計畫編號：NSC92-2313-B-002-141

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：龐飛 國立臺灣大學獸醫學系

摘要

離乳豬多系統消耗性症候群 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 是由第二型豬環狀病毒 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起，由於 PCV2 患豬常伴有繼發性病毒、細菌及黴菌感染，且 PCV2 與豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 在豬場的混合感染情形極為普遍，加上 PCV2 及 PRRSV 感染的標的細胞皆為單核球及巨噬細胞，因此釐清 PCV2 之致病機制及混合 PRRSV 感染對免疫細胞的影響，在對本病之控制及減輕其危害上將有所助益。本實驗以 PCV2 與 PRRSV 單獨感染或不同順序混合感染豬肺臟巨噬細胞 (AM) 分為六組包括：對照組 (G1)、單獨 PCV2 組 (G2)、單獨 PRRSV 組 (G3)、先有 PCV2 感染 18 小時再以 PRRSV 感染組 (G4)、先有 PRRSV 感染 18 小時再以 PCV2 感染組 (G5)、PCV2 與 PRRSV 兩病毒同時感染組 (G6) 進行研究。由 PCV2 高陽性率可知 AM 為 PCV2 重要保存細胞；而 PRRSV 感染率，除了 G4 由 5% 逐漸降至 1-2% 外，其餘各 PRRSV 感染組均維持在 5-10%。在存活率方面，PCV2 單獨感染並不造成 AM 死亡及凋亡，然而各 PRRSV 感染組，則有明顯細胞死亡及凋亡之情形，且以先有 PRRSV 感染之 G5 及單獨 PRRSV 感染之 G3 最為嚴重，而先有 PCV2 感染之 G4，呈現 AM 暫時性的吞噬力降低，但各 PRRSV 感染組則有明顯 AM 吞噬力下降之情形，並以先有 PRRSV 感染之 G5 及單獨 PRRSV 感染之 G3 最為嚴重，此外，並發現 PCV2 及 PRRSV 感染對 AM 內呼吸風暴 (respiratory burst) 產生之氧自由基 (oxygen free radical) O_2^- 及 H_2O_2 亦有顯著抑制之影響。另外，單獨 PCV2 感染與各 PRRSV 感染組，在殺菌力方面亦均明顯低於對照組，其中亦以先有 PRRSV 感染之 G5 及單獨 PRRSV 感染之 G3 最為嚴重。為了解釋是否 PCV2 的存在有抑制後續 PRRSV 對 AM 感染之影響，經進一步分析發現 PCV2 感染後能促使 AM 分泌大量 $IFN-\alpha$ ，此可能為導致後續 PRRSV 感染率下降之原因。在其他細胞激素表現方面，發現 PCV2 及/或 PRRSV 感染早期僅造成暫時的 $IL-1\beta$ 增加，但不論是在 PCV2 及 PRRSV 單獨

或共同感染組，相對於控制組皆有明顯增加 $IL-8$ 分泌之情形。由不同 PCV2 及 PRRSV 感染 AM 次序發現其所造成影響並不一致，亦可推測與現場共同感染 PCV2 及 PRRSV 豬隻所呈現不同病徵有關。而 PCV2 及 PRRSV 所誘導產生的 $IFN-\alpha$ 及 $TNF-\alpha$ 推測可能與 PMWS 豬隻發現之間質性肺炎致病機制有關。

關鍵詞：離乳豬多系統消耗性症候群、第二型豬環狀病毒、豬生殖與呼吸綜合症病毒、豬肺臟巨噬細胞

Abstract:

Porcine circovirus 2 (PCV2) is currently considered the primary causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Pigs affected by PMWS often suffered from secondary viral, bacterial, and fungal infection. In addition, dual infection of PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in pigs is common. It is known that the target cells of both PCV2 and PRRSV are monocytes/macrophages. Thus, evaluating the immunological effects and possible mechanism of action of PCV2 and PRRSV infection should contribute to the control and limiting of the disease. The present study was to compare the effects of the infection of both viruses, singular or combined, on swine alveolar macrophages (AMs). Six groups were designated, including control (G1), PCV2 alone (G2), PRRSV alone (G3), PRRSV following 18 h of initial PCV2 infection (G4), PCV2 following 18 h of initial PRRSV infection (G5), and concurrent PCV2/PRRSV infection (G6). High antigen containing rate without cytotoxic effect in G2 suggested that AMs were an important reservoir of PCV2. A low but constant infectious rate about 5-10% was noted in all PRRSV-infected groups except for G4. In G4, the PRRSV infectious rate was about 5% and gradually reduced and dropped to 1-2%. A transient decrease in phagocytosis but persistent significant reduction in microbial killing of *Candida albicans* in G2 indicated that PCV2-infected AMs might become dysfunction in against secondary pulmonary pathogens. In

G3 and G5, there was a marked increase in AM death and apoptosis, and reduction in its phagocytic and microbicidal capacities. In addition, inhibition in the production of oxygen free radical, O_2^- and H_2O_2 , were also observed in both PCV2 and/or PRRSV infected groups. A lower PRRSV infectious rate, cell death, and apoptosis, and higher phagocytic capacity than G3 and G5 were seen in G4 and G6. The results suggest that in dual infection the pre-existing or co-existing PCV2 may reduce not only PRRSV replication but also PRRSV-related AM dysfunction. High levels of interferon- α (IFN- α) and increasing levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) productions were seen in all PCV2-infected and in all PCV2 and/or PRRSV-infected groups, respectively. Further anti-IFN- α antibody blocking assay revealed that the PCV2-mediated reduction effect on PRRSV might be a result of PCV2's strong potential of IFN- α induction. In other cytokines' expression, PCV2 and/or PRRSV infection only caused a temporary increase in IL-1 β but a significant increased in the secretion of IL-8. Different infection orders of PCV2 and/or PRRSV in swine AMs leading to different results may explain, at least partially, the prominent clinic variations of PMWS-affected pigs in the field. The PCV2 and/or PRRSV-related IFN- α and TNF- α induction may also play a role in the pathogenesis of interstitial pneumonia in PMWS-affected pigs.

Keywords: postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine circovirus 2 (PCV2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine alveolar macrophages (AMs)

計畫緣由與目的

離乳豬多系統消耗症候群(postweaning multisystemic wasting syndrome ; PMWS)為一新興豬病，已確認為為豬環狀病毒(porcine circovirus, PCV)感染所致。世界各主要養豬國家，包括台灣，的許多養豬場皆受到本病的侵襲，由於目前尚無有效的控制方法，本病已造成養豬業的嚴重損失。由感染 PCV2 所造成之 PMWS，主要發生在離乳及保育豬隻，患豬呈現漸進性消瘦、呼吸症狀、黃疸及全身淋巴結嚴重腫大，其顯微病變特徵為間質性肺炎、肉芽腫性淋巴腺病、肝炎及腎炎，另外在病變區有融合細胞形成、淋巴細胞流失、組織球(histocyte)增生，以及於組織球內出現嗜鹼性葡萄串狀質內包涵體等特徵。本病近年已廣泛流行於美國、加拿大、英國、西班牙、丹麥、

荷蘭、德國、義大利、比利時、韓國等國家(Allan et al., 1998a; Daft et al., 1996; Kennedy et al., 1998; Lecann et al., 1997; Segale et al., 1997)。在一般養豬場甚至於管理良好之 SPF 豬場皆有本病之盛行，為導致相關產業主要經濟損失之一重要疾病。此外，為避免潛在的可能危險性，PCV2 的事先篩檢，已被建議在使用豬隻來源器官進行人體移植時應加以考量(Yoo et al., 2000)，故除獸醫界外，此病毒亦已逐漸受到世界各國醫學界的重視。本省於 1999 年已證實有 PMWS 的發生，且大部份的豬場均已受到侵犯。根據最近一份調查研究顯示，針對由本省 71 個養豬場所採集的 375 頭 4 至 12 週齡臨床上呈現衰弱仔豬之臟器(含扁桃腺、淋巴結、肺臟等)，經病毒分離、PCR 及限制酶切割片段多型性檢測，其中豬場及豬隻 PCV2 的陽性檢出率分別為 78.8% (56/71)及 67.9% (256/375)；此外，調查國內 24 個養豬場 1291 隻不同年齡豬隻之血清樣本，包括母豬、離乳豬、肥育豬及肉豬，發現 PCV2 的抗體陽性率更高達 89.94% (王群，2002)。本實驗室亦曾在檢測國內 SPF 豬隻血清時，發現有高力價之抗 PCV2 抗體的存在，再加上 PCV2 具有抗熱(60 $^{\circ}C$ 處理 30 分鐘仍有活性)及耐酸鹼之能力，極不易被撲滅，同時近年來本省各縣市的 PMWS 病例發生率亦有逐年上升之趨勢。這些證據均顯示 PCV2 感染應已迅速擴散至本省大多數的養豬場，本病對國內養豬業的影響實不容忽視。PCV2 感染豬隻進而引發 PMWS 之致病機制至今仍不明確。調查指出，在 PCV2 的感染豬隻經常發現有二次性的病毒、細菌及黴菌的感染，導致患豬的生長遲滯、淘汰率及死亡率更趨嚴重。由於 PCV2 感染的主要標的細胞之一為巨噬細胞，且 PMWS 豬隻常呈現呼吸困難及伴有間質性肺炎，在肺臟亦常有伺機性病原如 *Pneumocystis carini* 或 *Chlamydia* spp. (Clark et al., 1997) 的感染，而肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM) 在肺臟防禦系統中更扮演著不可或缺的重要角色，故擬以活體外感染方式，評估 PCV2 對 AM 病原防禦力之影響。由於 PCV2 感染之標的細胞為豬單核球(monocyte)及巨噬細胞，再加上淋巴組織為 PMWS 患豬發生病變的眾多組織中的一個主要部位，因此推測 PCV2 感染可能會對豬隻免疫系統造成影響，而此影響可能會進而牽動著豬場疫苗使用的效果、豬隻對抗疾病的能力及豬隻的增重及育成率，而這些影響將決定豬場的經營效益。在 PMWS 的臨床患豬及單純接種 PCV2 的實驗豬隻，均會出現全身淋巴結腫大的現象，在淋巴組織內則有 T 及 B 淋巴細胞流失及組織細胞(histocyte)聚集之病變；此外，亦有報告指出，PMWS 患豬之週邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell,

PBMC)群中，會呈現單核球增加、B及T淋巴球減少的現象 (Darwich et al., 2002; Segales et al., 2001)。雖然此結果顯示 PCV2 感染可能會因造成淋巴球數目的減少而導致豬隻免疫功能的受損，然而這些研究並未指明究竟 PMWS 患豬的血液淋巴球數下降是因 PCV2 對豬隻淋巴球的直接或是間接作用所致，以及除數目的減少外淋巴球本身的功能是否改變。目前的研究顯示，PCV2 感染的標的細胞主要為單核球及巨噬細胞；反之，在淋巴球部分，則僅有部分的 B 淋巴球會受感染 (Shibahara et al., 2000)。此外，經由組織病理學的檢查，卻發現在 PCV2 感染豬隻其淋巴組織的主要病變，在感染初期是淋巴細胞的增生，其後則轉為淋巴細胞的流失和凋亡，同時伴隨著組織球的大量入侵與增生(histiocytosis)、融合細胞的產生及典型質內包涵體之出現。而在本實驗室所進行的 PCV2 感染 AM 的初步實驗中，發現 AM 的 PCV2 感染率高達 95% 以上，由於血液單核球為巨噬細胞之前身，而此細胞會在受到病原感染或外來物質的刺激活化下，在進入組織後進而成熟為具抗原呈獻能力 (antigen-presenting) 的巨噬細胞及樹突細胞，進而參與後續的炎症反應或免疫反應調控，並與淋巴細胞的增生及凋亡有關。因此，是否 PCV2 對血液單核球或是由其衍生出來的巨噬細胞/樹突細胞亦有很高的感染率，而這些細胞在受到 PCV2 感染後，其本身的各項重要功能，包含各種免疫調節機制，發生了改變，因而導致淋巴細胞產生一連串的變化並進而牽動豬隻全身免疫系統功能的改變。為釐清這些疑點，本計劃亦將採用活體外感染的方式，探討 PCV2 對豬隻血液單核球、血液單核球所衍生之巨噬細胞和樹突細胞、以及淋巴細胞等重要免疫細胞之影響，及 PCV2 感染對此等細胞間交互作用(interaction)之直接與間接影響，進而評估 PCV2 感染在干擾豬隻免疫系統正常運作上所扮演之角色，並嘗試釐清 PCV2 之可能致病機制。此外，許多的研究報告結果亦顯示，單獨接種 PCV2，實際上並無法使絕大多數的受感染豬隻呈現典型的 PMWS 臨床症狀及嚴重病變 (Allan, et al 1998b; Allan et al., 2000; Saoulidis et al., 2002)，而許多的田間 PMWS 病例亦經常伴隨有豬生殖與呼吸綜合症病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) (Segales et al., 2002) 的感染。暗示著 PMWS 的產生可能除了 PCV2 這個必要的關鍵性病原外，PRRSV 的複合感染對於產生典型的田間 PMWS 亦具有一定的重要性。PCV2 與 PRRSV 皆能造成豬隻間質性肺炎，且常伴隨有二次性伺機病原之感染，而不論是國內或國外的研究皆顯示，在所收集的豬隻肺炎病材中，幾乎半數以上均可同時偵

測到有 PCV2 與 PRRSV 的存在，此等結果顯示 PCV2 與 PRRSV 在豬場的混合感染情形的確極為普遍 (Allan et al., 2000; Ellis et al., 1999; Segales et al., 2002)。亦有報告指出，PCV2 與 PRRSV 共同感染，可促進 PCV2 的複製，同時導致 PMWS 病變的加重及加劇由 PRRSV 所造成之間質性肺炎 (Harms et al., 2001)。由於 PCV2 及 PRRSV 的感染標的細胞皆為單核球及巨噬細胞，因此本計劃亦將比較 PCV2 及 PRRSV 兩種病毒單獨感染或以不同的感染順序混合感染，對前述 AM、血液淋巴球、血液單核球、以及由血液單核球所衍生之巨噬細胞和樹突細胞的各項非特異性及特異性防禦體系功能影響之差異性進行比較，以釐清 PCV2 單獨感染之致病機制及混合 PRRSV 感染對 AM 的影響，期能在 PMWS 之防控上有所助益。

結果與討論

由本實驗的結果發現 PCV2 病毒抗原陽性率在所有 PCV2 攻毒組皆維持在 95% 左右，單獨 PRRSV 病毒感染組其感染率約維持在 5-10% 之間，然而在先有 PCV2 感染組 (G4) 或同時有 PCV2 感染組 (G6) 發現，其 PRRSV 病毒感染率會隨著培養時間經過由 5-10% 減少至 1-2%。接著在細胞凋亡試驗發現 PCV2 的感染並不導致細胞發生凋亡之情形，PRRSV 病毒之感染則造成顯著的細胞凋亡發生，同樣的，在先有 PCV2 感染組 (G4) 或同時有 PCV2 感染組 (G6) 亦發現細胞因 PRRSV 病毒所導致的細胞凋亡現象相對於單獨 PRRSV 病毒感染組有明顯減少之情形。在肺臟巨噬細胞功能方面，發現 PCV2 的感染能暫時造成細胞吞噬念珠菌能力減少及明顯抑制細胞殺菌能力，而 PRRSV 病毒則能顯著抑制細胞吞噬及殺菌能力，接著並證實 PCV2 及 PRRSV 皆能抑制與肺臟巨噬細胞呼吸風暴與殺菌相關之氧自由基 (oxygen free radical) O_2^- 及 H_2O_2 產生。在細胞激素表現方面，PCV2 的感染能誘導細胞產生大量 IFN- α 及部分 TNF- α ，而 PRRSV 病毒感染則能使細胞產生多量 TNF- α ，但並不誘導產生 IFN- α ，另外亦發現 PCV2 及/或 PRRSV 感染僅造成暫時的 IL-1 β 增加，但不論是在 PCV2 及 PRRSV 單獨或共同感染組，相對於控制組皆有明顯增加 IL-8 分泌之情形。在先有 PCV2 感染之 PRRSV 感染組 (G4) 或同時有 PCV2 感染組 (G6) 發現有抑制 PRRSV 病毒所導致的感染、細胞凋亡及減少吞噬能力之現象，同樣的，UV 不活化的 PCV2 上清液亦被證實可有效抑制 PRRSV 在 MARC-145 感染情形。為了解釋是否 PCV2 的存在有抑制後續 PRRSV 對 AM 感染之影響，經進一步分析發

現 PCV2 感染後能促使 AM 分泌大量 IFN- α ，此可能為導致後續 PRRSV 感染率下降之原因。接著在 PRRSV 病毒感染 MARC-145 實驗加入抗 IFN- α 抗體則能有效抑制 PCV2 上清液之抗 PRRSV 能力，證實 PCV2 感染可誘導產生 IFN- α 抑制其他後續病毒感染。雖然以抗 IFN- α mAb 與 G4 一起培養並無法抑制 PCV2 在 AMs 所造成之抗 PRRSV 感染情形，接著發現的 UV 不活化之 PCV2 仍能有效的誘導 AMs 產生 IFN- α ，可能可用以解釋為何 UV 不活化之 PCV2 上清液無法有效的被抗 IFN- α mAb 中和之現象。由以上結果證實 PCV2 感染豬肺臟巨噬細胞具有高陽性率，由接著的實驗亦證實不論活的或 UV 不活化的 PCV2 病毒抗原皆可在攻毒早期出現於 AMs 細胞質，並隨著培養時間有漸漸增加之情形，這代表著 PCV2 進入 AMs 不只經由病毒感染的方式，而胞飲或吞噬作用亦可能為一重要途徑，這或許可用以解釋為何在巨噬細胞內偵測到的 PCV2 並無發生複製之情形。另外，不論由 PCV2 或 PRRSV 皆可發現有影響巨噬細胞吞噬及殺菌之情形，這與 PMWS 豬隻亦發生二次性病原感染或免疫抑制有關。而由不同 PCV2 及 PRRSV 感染 AMs 次序發現其所造成影響並不一致，或許可以說明為何在現場的 PMWS 患豬常呈現不同的病徵有關。

計畫成果自評

本研究證實 PCV2 能躲在巨噬細胞質內，以躲避免疫系統的監控，同時亦能藉巨噬細胞於體內遊走而協助病毒的散播，並能對豬隻免疫細胞造成功能上之干擾，而此可能與田間 PMWS 豬隻易有二次感染相關；並發現當 PCV2 與 PRRSV 病毒在不同次序共同感染下亦有不同結果，這與釐清 PCV2 或與 PRRSV 共同感染之豬場所可能造成的影響及其致病機制將有所助益；另外，更發現不論活的或 UV 不活化的 PCV2 皆能誘導產生大量炎症前期細胞激素 IFN- α ，此亦影響著 PMWS 豬隻疾病的發生型式。以上結果已撰寫成論文並將投稿於國外知名雜誌。未來將研究 PCV2 在豬其他相關免疫細胞可能之影響，期能對 PMWS 豬隻的致病機制有進一步的了解。

參考文獻

1. 王群。台灣豬環狀病毒基因型分析及抗體盛行率調查。國立台灣大學獸醫學研究所碩士論文。2002。
2. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clark ED, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. Isolation of porcine circovirus-like virus from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10:

- 3-10, 1998.
3. Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Ellis JA, Connor TJ, McNair I, Krakowka S, Kennedy SA. Sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 81-94, 2000.
4. Allan GM, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142: 467-468, 1998.
5. Clark, EG. Postweaning multisystemic wasting syndrome. *Proc Am Assoc Swine Prac* 499-501, 1997.
6. Daft B, Nordhausen RW, Latimer KS, Niagro FD. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a 6 week-old pig. 39th Meeting of the Am Assoc Vet Lab Diagn AR 32, 1996.
7. Darwich L, Segales J, Domingo M, Mateu E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 236-42, 2002.
8. Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haine D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 11: 3-14, 1999.
9. Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38: 528-39, 2001.
10. Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Adair B, Hughes A, Spillane P. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec* 142: 495-496, 1998.
11. LeCann P, Albina E, Madec F, Cariolet R, Jestin A. Piglet wasting disease. *Vet Rec* 141: 660, 1997.
12. Saoulidis K, Lekkas S, Miliotis ChC, Papoutsis PA, Kennedy S. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning

- multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 126: 38-46, 2002.
13. Segales J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, Lopez-Fuertes L, Quintana J, Rodriguez-Arriola G, Calsamiglia M, Pujols J, Dominguez J, Domingo M. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81: 37-44, 2001.
 14. Segales J, Calsamiglia M, Rosell C, Soler M, Maldonado J, Martin M, Domingo M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol* 85: 23-30, 2002.
 15. Segales J, Sitjar M, Domingo M, Dee S, Del Pozo M, Noval R, Sacristan C, De las Heras A, Ferro A, Latimer KS. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601, 1997.
 16. Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y, Kadota K. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 62: 1125-31, 2000.
 17. Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 64: 193-203, 2000.