

豚 サイトメガロウイルス病の診断

芝原友幸^{1)†} 関口真樹²⁾ 宮崎綾子¹⁾ 田島朋子³⁾
 清水真也¹⁾ 久保正法⁴⁾

- 1) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
- 2) 千葉県中央家畜保健衛生所 (〒285-0072 佐倉市岩富町497)
- 3) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)
- 4) 全農家畜衛生研究所 (〒285-0043 佐倉市大蛇町7)

Diagnosis of porcine cytomegalovirus infection

Tomoyuki SHIBAHARA^{*†}, Maki SEKIGUCHI, Ayako MIYAZAKI, Tomoko TAJIMA,
 Shinya SHIMIZU and Masanori KUBO

National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

(2011年11月10日受付・2012年1月20日受理)

はじめに

近年、豚サイトメガロウイルス (Porcine cytomegalovirus : PCMV) 病に関する病性鑑定が多くなりつつある (表1)。これらの症例の多くは胎子期あるいは新生子期に感染したと考えられ、致死性の重篤な症状を示している [1]。

本稿では、PCMV病に関する現在までの知見をまとめるとともに、著者ら [1] が確立した *In situ* hybridization と免疫組織化学について紹介する。

PCMV と封入体鼻炎

1955年イギリスでPCMV病が「封入体鼻炎」として初めて報告された [2]。この「封入体鼻炎」という病名は、鼻炎を呈した豚の鼻甲介粘膜の腺上皮細胞が巨大化し、好塩基性核内封入体がみられたことに由来する [3]。

分類

PCMV (Suid herpesvirus 2, 豚ヘルペスウイルス2) はヘルペスウイルス科, ベータヘルペスウイルス亜科に分類されているがその属名は未定である (International

Committee on Taxonomy of Viruses : ICTV) [3]。つまり、2011年10月1日現在、PCMVはサイトメガロウイルス属には分類されていない。

PCMVのゲノムは直鎖状、2本鎖DNAである。ウイルス遺伝子の全塩基配列や構成の詳細は分っていない。しかし、DNA polymerase 遺伝子 [4, 5], glycoprotein B 遺伝子 [6] 及び major nucleocapsid protein 遺伝子 [7] の解析により、PCMVは人のヘルペスウイルス6型及び7型 (*Roseolovirus* 属) と遺伝学的に近縁であることが判明している。

ウイルス性状

PCMVは、典型的なヘルペスウイルス粒子の形態を持ち [8-10]、その直径は約150~200nmである。さまざまな形態をとる電子密度の高いコア (30~70nm) とその周囲には二十面体のヌクレオカプシド (80~120nm) がみられる。エンベロープは宿主細胞の核あるいはゴルジ装置の膜から出芽するときに獲得する [8-10]。

株間の遺伝学的及び血清学的相違

PCMVにおいて血清型や遺伝子型の存在は報告され

† 連絡責任者：芝原友幸 (動物衛生研究所)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7774 E-mail : tshiba@affrc.go.jp

† Correspondence to : Tomoyuki SHIBAHARA (National Institute of Animal Health)

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL・FAX 029-838-7774 E-mail : tshiba@affrc.go.jp

表1 豚サイトメガロウイルス病の発生状況

	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
発生戸数	0	0	1	0	0	6	3	2	7	3
発生頭数	0	0	30	0	0	33	32	45	15	4
死産頭数	0	0	4	0	0	15	7	17	15	2

農林水産省消費・安全局 畜産安全管理課, 動物衛生課 編集・発行 家畜衛生週報より抜粋

ていない。しかし、異なる場所から分離されたPCMV株のDNA polymerase [11] と glycoprotein B 遺伝子 [6] には、ある程度の地理的な多様性がある。

病理組織学的にPCMV病と診断された材料と抗PCMV J1株血清 [9] を用いた免疫組織化学的検索では、陽性反応を示す封入体と、反応しないものが明瞭に分けられた [1]。また、ELISAにおいて抗原学的な多様性を示唆する報告もある [12]。しかし、現時点ではDNA polymerase 遺伝子 [4, 5], glycoprotein B 遺伝子 [6] 及び major nucleocapsid protein 遺伝子 [7] 以外のウイルス蛋白遺伝子については調べられておらず、上記のような反応性の相違にどのようなウイルス抗原が関与しているかは不明のままである。

上記のようなPCMVに関する断片的な解析結果 [1] とこれまでの他のヘルペスウイルス分類を考慮すると、PCMVの分離株はいくつかの属 (サイトメガロウイルス属, *Roseolovirus* 属など) に分類される可能性がある。

疫 学

PCMV感染は世界中でみられる [13]。ヨーロッパ [14] 及び北アメリカでは90%以上の豚が感染している [3, 11, 15]。日本では、1981年に45都道府県で飼育されている肥育豚を対象とした調査により98.4% (441頭中434頭) の豚が抗体を保有していることが分っている [16]。しかし、この調査以降、現在まで大規模な調査は行われていない。

伝 播 経 路

PCMVは口や鼻を介して水平伝播する一方で、垂直伝播もよく起こる [3, 17, 18]。コマーシャル農場では、出産前後に感染する [19, 20]。

他のヘルペスウイルスと同様に、PCMVは潜伏感染し、再活性化するとウイルスを体外へ排泄する [21, 22]。

豚以外のキャリアーや節足動物等のベクターは報告されていない。また、PCMVはマウス、兎、犬、猫、鶏胚では増殖しない。自然感染は豚に限定されるものの、豚由来の組織を移植されたヒヒの組織中での増殖が確認されている [23]。



図1 PCMVに感染した豚。鼻汁、発育不良、被毛粗剛がみられる。

臨 床 症 状

先天的あるいは出生前後に感染した新生豚では、明らかな症状を示さないまま死亡する例 [24] や、震え、クシャミ、呼吸異常、増体率の減少、鼻炎、肺炎がみられる例 [3, 13, 17, 25, 26]、また神経症状を呈する例もみられる [3]。

若齢豚にみられる封入体鼻炎の初期症状はクシャミで、まれに発咳まで病状が進行する (図1)。重度の結膜異常に至った症例では、目の周りが黒くなる。一方、3週齢以上の豚では、通常、合併症を伴わなければ臨床症状はみられない。

高感受性豚群 (すなわちPCMVに対する免疫レベルの低い群) でPCMVが感染した場合、繁殖障害が問題となる [3, 17, 18, 27]。妊娠豚は分娩予定日にミイラ胎子や死亡胎子とともに、虚弱豚を娩出する。1腹の25%以上が死亡し、生き残った豚も発育不良となる。子豚は蒼白で、さまざまな程度の水腫 (顎や足根関節周囲) がみられることもある。感染した群では、離乳前の事故率も上昇する。しかし、母豚は妊娠期間を通して、嗜眠や食欲不振以外、明らかな臨床症状を起こさない。

潜伏期間は約10~20日 [17, 28]、罹患率は100%である。感受性群での平均的な致死率は約10%であるが、50%にも上ることもある。

増殖部位

PCMVの最初の増殖部位は、鼻粘膜、涙腺、ハーダ一腺である。細胞随伴性ウイルス血症は、3週齢以上の豚では感染後14～21日、新生豚では感染後5～19日に起こる [17, 21, 24]。ウイルス血症の後、PCMVは鼻、咽頭、結膜の分泌物、尿に排出される [17, 21, 29]。鼻からの排泄は感染後10日から始まり、30日以上続く。PCMVは肺、腎臓でもよく増殖する。先天性に感染した豚は終生ウイルスを排泄する [17]。PCMVは肺のマクロファージ、血中の単球及びCD8⁺T細胞で持続的に感染する [17, 30]。

母豚の子宮頸管から分離されるウイルスは、胎子由来と推察されている [3]。

抗体と免疫

ウイルス血症がおさまると、間接蛍光抗体法 (IFA) で検出される IFA 抗体価が上昇する。感染実験では IFA 抗体はウイルス接種後2～3週で認められ、6週でほぼピークになり、10～11週まで高い抗体価を維持する [17, 21]。鼻汁への PCMV 排泄は IFA 抗体価が上昇後さらに2～3週間続く。同様の抗体応答は、コマーシャル農場でもみられ [19]、出荷時 (23週齢) でも高い抗体価が検出される。IFA 抗体に比べると中和抗体の上昇は遅く、そのレベルは低いため、長い期間ウイルスが排泄される。

母豚の IFA 抗体価が高ければ、ある程度感染防御される。しかし、IFA 抗体価が低い母豚が再感染すると、胎盤感染が起こる [31]。

先天感染や新生豚での感染では、抗体価の上昇は起こらないが、ウイルスを排泄し、致死的な全身感染を引き起こす [17]。移行抗体は生後約2カ月まで検出される [32]。発症は移行抗体である程度防御されるが、移行抗体があってもウイルスは排泄される [19]。

なお、株間の交差防御や細胞性免疫など免疫に関する重要な情報はない。

豚群診断

豚群内における PCMV の存在を証明するには、肥育から出荷豚の血清をランダムにサンプルし、血清学的 (IFA 又は ELISA) に判断するのが最も簡便である。コマーシャル農場での IFA 抗体価は、多くの豚が 1:64 から 1:128 だが、中には 1:1024 の豚もいる。ELISA は、IgG と IgM を区別できるため農場において直近の感染豚を摘発するのに適している [16, 33]。子宮内感染した豚は、PCMV 抗体を持たないので注意するべきである。

分離培養

1960年代、豚肺由来初代培養細胞 (primary pig lung cells : PL cells) を用いて PCMV の分離培養 [29, 34] が実施されていた。1970年代には豚肺由来マクロファージ (pig lung macrophages : PLM) [35] が高い感受性を持つことが分った。さらに、豚精巣由来初代培養細胞 (primary swine testicle cells : ST cells) [3, 9]、豚卵管上皮由来株化細胞 (porcine fallopian tube cells : PFT cells) [36, 37]、豚腎由来株化細胞 (porcine kidney PK-15 cells : PK-15細胞) [3]、豚精巣由来株化細胞 (porcine turbinate cells : PT cells) [3] などが PCMV に感受性を示す。

ウイルス分離は前述の初代培養細胞か株化細胞系で行うことができる。PFT細胞にウイルスを接種後、テトラデカノールホルポール-12-酢酸を加えると、ウイルス力価が10倍から100倍に上昇する [38]。

PCMV 接種後3～14日目の感染細胞は巨大化し、好塩基性核内封入体が認められる [35]。感染細胞は正常細胞の約6倍の大きさになり、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置の腫大がみられる [8]。接種後10～14日後にはウイルス力価は最大 $10^{5\sim6}$ TCID₅₀/ml に達する。ウイルス産生量 (ウイルス力価) は初代培養細胞よりも株化細胞において低くなる。他のヘルペスウイルスに比べると PCMV の細胞変性効果 (CPE) は判断が難しい。このため IFA、免疫組織化学等でウイルス増殖を確かめる必要がある。IFA には PCMV 接種細胞をアセトン固定して使用する [3, 19]。

確定診断

PCMV 病の確定診断は、ウイルス学的検査と病理組織学的検査の結果を総合して判断する必要がある。ウイルス分離には PCMV に高い感受性を示す PLM が適しているが、PCMV やマイコプラズマ等に汚染されていない SPF 豚又は無菌豚より調製する必要があるため、分離を試みることのできる施設は限られている。そのため多くの病性鑑定施設では、病理組織学的検査と DNA polymerase 遺伝子 [5] あるいは major capsid protein 遺伝子 [7] を標的とする polymerase chain reaction (PCR) による PCMV 特異遺伝子の検出が実施されている [5, 15, 39]。

感染と発症は明確に区別しなければならない。感染率が非常に高く潜伏感染する PCMV の場合は、特異抗体 [16, 32] あるいは遺伝子の検出のみでは PCMV 病の確定診断には至らない。臨床所見、肉眼病変、組織病変及び微生物学的検査等を含め総合的に判断する必要がある。

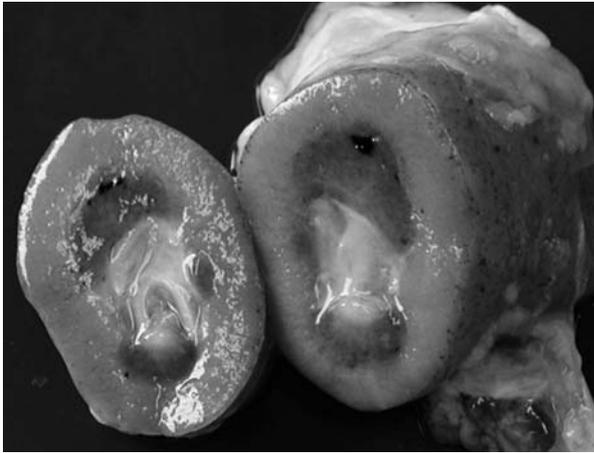


図2 PCMVに感染した豚の腎臓皮質に点状出血がみられる。

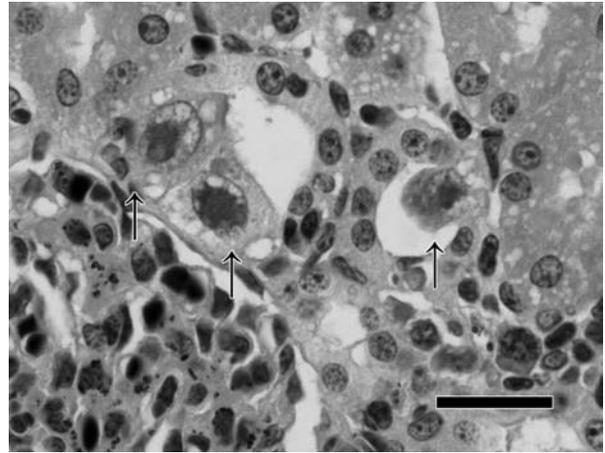


図3 腎臓. 腫大した核の中に明瞭な好塩基性核内封入体(矢印)がみられる (HE染色 Bar = 20 μm).

ウイルス学的検査

生前の検査材料は、鼻汁及び鼻粘膜ぬぐい液、全血が適している [24, 35]. 解剖時のサンプルは、鼻甲介粘膜、肺、肺洗浄液、腎臓が好ましい [20, 21]. 妊娠早期の繁殖障害であれば、胎子の脳、肝臓、骨髄が適している [17, 18, 31].

肉眼病変と組織病変

PCMVの病変は大きく2つに分けられる。それらは

- 1 胎子や新生豚にみられる全身細網内皮組織の病変、
- 2 日齢の進んだ豚でみられる上皮組織の病変である。

日齢と病変

1 胎子や新生豚にみられる全身細網内皮組織の病変 (肉眼病変)

胎子や新生豚では、水腫と点状出血が全身にみられる。皮下水腫は顎や足根関節周囲で最も顕著にみられる。水腫は一般的に胸腔臓器と胸部皮下組織にもみられる。胸腔では、心外膜や胸膜に滲出物がみられる。肺は水腫性で、小葉間が拡張し、葉の腹側先端部は紫色を帯びて硬化する。リンパ節はすべて腫大し、水腫性で、点状出血がみられる。点状出血は腎臓 (図2)、特に被膜下で最も顕著であり、斑状になる例もあり、色調は紫色や黒色に見えるくらいまで程度はさまざまである。

妊娠豚では死産、ミイラ胎子、胚死がみられる。ミイラ胎子は、さまざまなステージのものがみられる。

(組織病変)

急性の致死性感染では、封入体は全身の毛細血管内皮細胞にみられる [17, 31]. 血管内皮細胞が障害されるため部分的な水腫と出血がみられる。また、封入体を伴った単球が血管内や脾臓にみられる。感染マクロファージは肺胞に多数みられる。肝細胞では巣状壊死がみられ

る。腎臓の乳頭部と糸球体の毛細血管に高頻度に封入体がみられる。中枢神経系、特に脈絡膜叢、小脳、嗅球では、出血やグリオーシスが認められる [3].

胎子が妊娠早期にPCMVに感染すると、ウイルスは髄膜、クッパー細胞、腹膜のマクロファージ、骨膜細胞で優先的に増殖する [18]. 着床後すぐに感染した胎子は死亡する。

2 日齢の進んだ豚でみられる上皮組織の病変 (肉眼病変)

日齢の進んだ豚では、上皮組織を含め明らかな肉眼病変はみられない。

(組織病変)

組織学的には、好塩基性核内封入体や巨細胞化が鼻粘膜腺、ハーダー腺の腺房や導管、涙腺、腎尿細管上皮細胞 (図3) にみられる [9, 17, 19, 24, 40]. 封入体は食道の粘膜腺、精巢上尿管の上皮細胞、輸精管上皮細胞、十二指腸や空腸の上皮細胞にもしばしばみられる。ウイルスの増殖部位では、巣状のリンパ球過形成がみられる。腎臓では、間質性非化膿性炎がみられる [40]. 中枢神経系には巣状のグリオーシスが散在性にみられ、時折グリア細胞中に封入体が認められる。

In situ hybridizationと免疫組織化学

病理組織学的検査で、典型的な病変と核内封入体の形成が確認できる症例は容易にPCMV病の確定診断を下すことができる。一方、それらが不明瞭な症例では、確定診断が難しくなる。このように病変形成が軽度なため、PCMVの関与が見落とされている症例が少なくないことは病性鑑定を実施する上で問題となる。また、他の病原体の混合感染により、病変が複雑になり、原因の特定が難しい症例も多いのが現状である。

これらの問題を解決するために、近年われわれは、

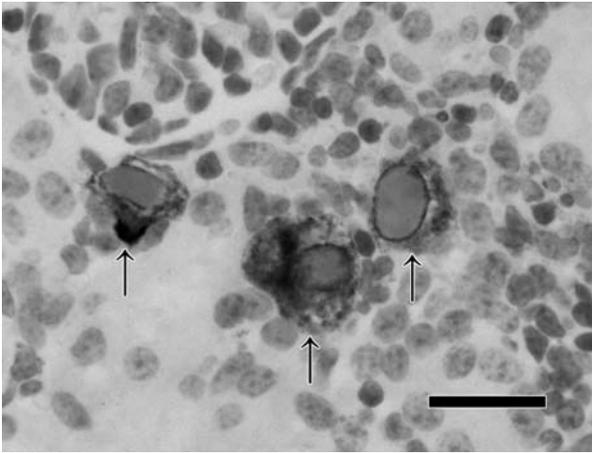


図4 腎臓. 巨大化した腎尿細管上皮細胞に一致して抗PCMV血清に対する陽性反応(矢印)がみられる。(免疫組織化学 Bar = 20 μ m)

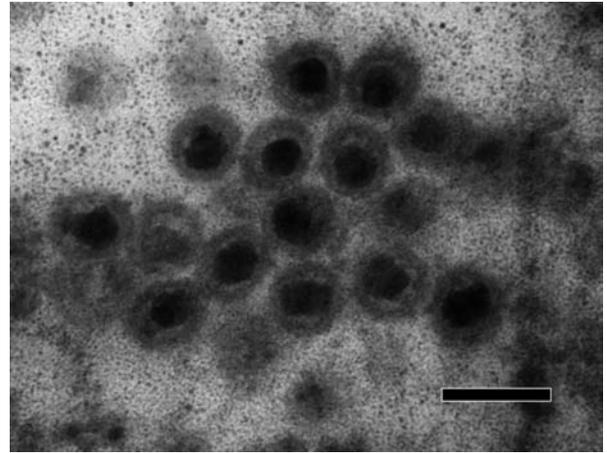


図6 腎臓. 巨大化した腎尿細管上皮細胞の細胞質内にヘルペスウイルス粒子が多数認められる。(透過型電子顕微鏡像 Bar = 200nm)

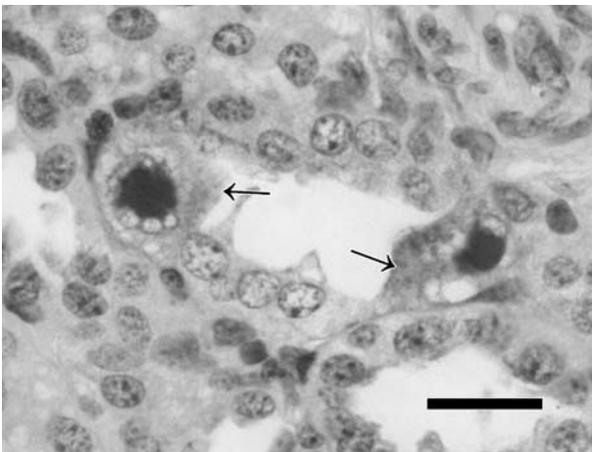


図5 腎臓. 巨大化した腎尿細管上皮細胞に一致してPCMVのmRNA(矢印)が認められる。(In situ hybridization Bar = 20 μ m)

PCMV抗原(図4)とmRNA(図5)の組織内局在を明らかにする方法を確立した[1]。この2つの検査方法は、HE染色と比較して高い特異性があり、対比染色の青色に対してコントラストが高く鮮明な強い赤色の反応が得られる。このため、PCMV感染細胞を容易に検出でき、これらの技術は、診断手法としても有用であることが確認されている[1]。

電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡では、ヘルペスウイルス粒子が鼻甲介粘膜腺、涙腺、唾液腺、腎臓尿細管の各上皮細胞(図6)にみられる[25]。

類症鑑別

PCMVによる呼吸器疾患や繁殖障害は、豚コレラウイルス、エンテロウイルス、パルボウイルス、豚繁殖・

呼吸障害症候群ウイルスやオーエスキー病ウイルス感染によるものとは明らかに異なっている。

かつてはPCMVと*Bordetella bronchiseptica*の同時感染で萎縮性鼻炎が悪化するといわれていたが[3, 13]、実験感染で相乗効果は確認できていない[41]。つまり、PCMV感染では萎縮性鼻炎は起こらない[14]。

予防と飼育環境

PCMV病に対するワクチンや治療法はない。

日本では近年、繁殖・離乳・肥育の施設を農場立地ごと分散させるスリーサイト方式(あるいはツーサイト方式)を採用する養豚事業主が増えてきている。このようなバイオセキュリティシステムを導入した農場では、ウイルス感染環が分断されるため、群における免疫レベルが低下し、豚群がPCMV高感受性群になる可能性がある。

導入のストレスにより潜伏感染していた豚においてウイルスが再活性化し、豚群にPCMVが導入される可能性がある。

最後に

今後は、分類学的解析を進めるとともに、株間の病原性の違いに関する詳細な研究が必要である。

稿を終えるにあたり、指導、助言をいただいた川島健司氏、Mr. Emmanuel Kabali、高野儀之氏、佐々木羊介氏、清水稚恵氏、水戸部俊治氏、石関紗代子氏、梁川直宏氏、片山貴志氏、平野晃司氏、永田麻理子氏、瀬尾泰隆氏、小林 勝技師、嶋田恵美技師に深謝する。

引用文献

[1] Sekiguchi M, Shibahara T, Miyazaki A, Tajima T, Shimizu S, Kabali E, Takano Y, Sasaki Y, Kubo M: *In*

- situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine cytomegalovirus, J Virol Methods, 179, 272-275 (2012)
- [2] Done JT : An "inclusion body" rhinitis of pigs, Vet Rec, 67, 525-527 (1955)
- [3] Yoon K, Edington N : Porcine cytomegalovirus, Diseases of Swine, 9th ed BE Straw et al. eds, 323-329, Blackwell Publishers, Ames, IA. (2006)
- [4] Rupasinghe V, Tajima T, Maeda K, Iwatsuki-Horimoto K, Sugii S, Horimoto T : Analysis of porcine cytomegalovirus DNA polymerase by consensus primer PCR, J Vet Med Sci, 61, 1253-1255 (1999)
- [5] Widen BF, Lowings JP, Belak S, Banks M : Development of a PCR system for porcine cytomegalovirus detection and determination of the putative partial sequence of its DNA polymerase gene, Epidemiol Infect, 123, 177-180 (1999)
- [6] Widen F, Goltz M, Wittenbrink N, Ehlers B, Banks M, Belak S : Identification and sequence analysis of the glycoprotein B gene of porcine cytomegalovirus, Virus Genes, 23, 339-346 (2001)
- [7] Rupasinghe V, Iwatsuki-Horimoto K, Sugii S, Horimoto T : Identification of the porcine cytomegalovirus major capsid protein gene, J Vet Med Sci, 63, 609-618 (2001)
- [8] Duncan JR, Ramsey FK, Switzer WP : Electron microscopy of cytomegalic inclusion disease of swine (inclusion body rhinitis), Am J Vet Res, 26, 939-947 (1965)
- [9] Shirai J, Narita M, Iijima Y, Kawamura H : A cytomegalovirus isolated from swine testicle cell culture, Jpn J Vet Sci, 47, 697-703 (1985)
- [10] Valicek L, Smid B : Electron microscopy of porcine cytomegalovirus in pig lung macrophage cultures, Zentralbl Veterinarmed B, 26, 371-381 (1979)
- [11] Goltz M, Widen F, Banks M, Belak S, Ehlers B : Characterization of the DNA polymerase loci of porcine cytomegaloviruses from diverse geographic origins, Virus Genes, 21, 249-255 (2000)
- [12] Tajima T, Kawamura H : Serological relationship among porcine cytomegalovirus Japanese isolates and a UK isolate, J Vet Med Sci, 60, 107-109 (1998)
- [13] Corner AH, Mitchell D, Julian RJ, Meads EB : A generalized disease in piglets associated with the presence of cytomegalic inclusions, J Comp Pathol, 74, 192-199 (1964)
- [14] Rondhuis PR, de Jong MF, Schep J : Indirect fluorescence antibody studies of porcine cytomegalovirus infections in the Netherlands, Tijdschr Diergeneeskd, 105, suppl 2 : 56-68 (1980)
- [15] Hamel AL, Lin L, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP : PCR assay for detecting porcine cytomegalovirus, J Clin Microbiol, 37, 3767-3768 (1999)
- [16] Tajima T, Hironao T, Kajikawa T, Kawamura H : Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the seroepizootiological survey of antibodies against porcine cytomegalovirus, J Vet Med Sci, 55, 421-424 (1993)
- [17] Edington N, Watt RG, Plowright W : Experimental transplacental transmission of porcine cytomegalovirus, J Hyg, 78, 243-251 (1977)
- [18] Edington N, Wrathall AE, Done JT : Porcine cytomegalovirus (PCMV) in early gestation, Vet Microbiol, 17, 117-128 (1988)
- [19] Plowright W, Edington N, Watt RG : The behaviour of porcine cytomegalovirus in commercial pig herds, J Hyg, 76, 125-135 (1976)
- [20] Watt RG : Virological study of two commercial pig herds with respiratory disease, Res Vet Sci, 24, 147-153 (1978)
- [21] Edington N, Watt RG, Plowright W : Cytomegalovirus excretion in gnotobiotic pigs, J Hyg, 77, 283-290 (1976)
- [22] Narita M, Shimizu M, Kawamura H, Haritani M, Moriwaki M : Pathologic changes in pigs with prednisolone-induced recrudescence of herpesvirus infection, Am J Vet Res, 46, 1506-1510 (1985)
- [23] Mueller NJ, Barth RN, Yamamoto S, Kitamura H, Patience C, Yamada K, Cooper DK, Sachs DH, Kaur A, Fishman JA : Activation of cytomegalovirus in pig-to-primate organ xenotransplantation, J Virol, 76, 4734-4740 (2002)
- [24] Edington N, Plowright W, Watt RG : Generalized porcine cytomegalic inclusion disease : distribution of cytomegalic cells and virus, J Comp Pathol, 86, 191-202 (1976)
- [25] Duncan JR, Ross RF, Switzer WP : Incidence of inclusion-body rhinitis in Iowa swine, J Am Vet Med Assoc, 144, 33-37 (1964)
- [26] Orr JP, Althouse E, Dulac GC, Durham PJ : Epizootic infection of a minimal disease Swine herd with a herpesvirus, Can Vet J, 29, 45-50 (1988)
- [27] Smith KC : Herpesviral abortion in domestic animals, Vet J, 153, 253-268 (1997)
- [28] Goodwin RF, Whittlestone P : Inclusion-body rhinitis of pigs : an experimental study of some factors that affect the incidence of inclusion bodies in the nasal mucosa, Res Vet Sci, 8, 346-352 (1967)
- [29] Booth JC, Goodwin RF, Whittlestone P : Inclusion-body rhinitis of pigs : attempts to grow the causal agent in tissue cultures, Res Vet Sci, 8, 338-345 (1967)
- [30] Guedes MI, Risdahl JM, Wiseman B, Molitor TW : Reactivation of porcine cytomegalovirus through allogeneic stimulation, J Clin Microbiol, 42, 1756-1758 (2004)
- [31] Edington N, Broad S, Wrathall AE, Done JT : Superinfection with porcine cytomegalovirus initiating transplacental infection, Vet Microbiol, 16, 189-193 (1988)
- [32] Tajima T, Hironao T, Kajikawa T, Suzuki Y, Kawamura H : Detection of the antibodies against porcine cytomegalovirus from whole blood collected on the blood sampling paper, J Vet Med Sci, 56, 189-190 (1994)
- [33] Assaf R, Bouillant AM, Di Franco E : Enzyme linked

- immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to porcine cytomegalovirus, *Can J Comp Med*, 46, 183-185 (1982)
- [34] L'Ecuyer C, Corner AH : Propagation of porcine cytomegalic inclusion disease virus in cell cultures. Preliminary report, *Can J Comp Med Vet Sci*, 30, 321-326 (1966)
- [35] Watt RG, Plowright W, Sabo A, Edington N : A sensitive cell culture system for the virus of porcine inclusion body rhinitis (cytomegalic inclusion disease), *Res Vet Sci*, 14, 119-121 (1973)
- [36] Bouillant AM, Dulac GC, Willis N, Girard A, Greig AS, Boulanger P : Viral susceptibility of a cell line derived from the pig oviduct, *Can J Comp Med*, 39, 450-456 (1975)
- [37] Kawamura H, Tajima T, Hironao T, Kajikawa T, Kotani T : Replication of porcine cytomegalovirus in the 19-PFT cell line, *J Vet Med Sci*, 54, 1209-1211 (1992)
- [38] Kawamura H, Matsuzaki S : Influence of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate on replication of porcine cytomegalovirus in the 19-PFT-F cell line, *J Vet Med Sci*, 58, 263-265 (1996)
- [39] Fryer JF, Griffiths PD, Fishman JA, Emery VC, Clark DA : Quantitation of porcine cytomegalovirus in pig tissues by PCR, *J Clin Microbiol*, 39, 1155-1156 (2001)
- [40] Kelly DF : Pathology of extranasal lesions in experimental inclusion-body rhinitis of pigs, *Res Vet Sci*, 8, 472-478 (1967)
- [41] Edington N, Smith IM, Plowright W, Watt RG : Relationship of porcine cytomegalovirus and B bronchiseptica to atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets, *Vet Rec*, 98, 42-45 (1976)