

Situation épidémiologique actuelle de la diarrhée épidémique porcine dans le monde et caractéristiques physiopathologiques de la maladie

Béatrice Grasland (1) (beatrice.grasland@anses.fr), Nicolas Rose (1)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, Ploufragan, France

Résumé

Depuis 2013, une épizootie sévère de diarrhée épidémique porcine (DEP) affecte les Etats-Unis et s'étend aujourd'hui à plusieurs pays dans le monde. Les signes cliniques sont une diarrhée aqueuse pouvant être accompagnée de vomissements. Les porcelets sous la mère sont les animaux principalement affectés et les taux de mortalité observés chez cette catégorie d'animaux lors de cette épizootie atteignent 95-100 %. Les animaux adultes peuvent être touchés mais le taux de mortalité est au maximum de 5 %. La maladie est causée par un alpha-coronavirus appelé virus de la DEP (vDEP) qui ne présente pas de caractère zoonotique. Les nouveaux variants de vDEP isolés depuis 2013 montrent une pathogénicité accrue par rapport aux souches de vDEP circulant dans les années 80 en Europe. La dose minimale infectante de ces nouveaux variants de vDEP est très faible et le virus présente une résistance importante à différents traitements physiques. Ces données mettent en évidence que le vDEP peut être propagé efficacement par l'homme en intervenant directement dans les élevages (transport mécanique), ou par l'intermédiaire de matériel contaminé. En Europe, l'immunité de population vis-à-vis du vDEP est faible et la DEP a été ajoutée à la liste des dangers sanitaires de première catégorie en France rendant obligatoire la déclaration de tout cas de DEP. En cas d'introduction en France, seule une identification rapide du ou des premiers cas permettra la mise en place rapide de mesures de gestion combinées à des mesures de biosécurité strictes pour limiter la propagation de la maladie.

Mots-clés : diarrhée épidémique porcine, caractéristiques cliniques, physio-pathogénie

Current epidemiologic situation of porcine epidemic diarrhea in the world and physio-pathogeny of the disease

Abstract

Since 2013, an acute epizooty of Porcine epidemic diarrhea (PED) has affected the USA and is now spreading to several countries all around the world. Clinical signs are represented by a profuse aqueous diarrhea with sometimes vomiting, mainly observed in suckling piglets with mortality rate reaching up to 95-100% in this animal category. Adult animals can be affected with a lower mortality rate (maximum 5%). The etiological agent is an alpha-coronavirus, called Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and is not zoonotic. New variants of PEDV isolated in 2013 showed a high pathogenicity compared to strains previously isolated in Europe in the 80's. The minimal infectious dose of these new PEDV variants is very low and PEDV is highly resistant to physical treatments. Thus PEDV can be efficiently propagated by people entering herds (mechanical carriers) or through the use of material potentially contaminated. In Europe, the immune status of the pig population against PEDV is low. In France, PED is now classified in list of the first category of animal health hazards making notification of all cases compulsory. In case of introduction in France, only a fast identification of the first case(s) will allow to implement rapidly control measures together with reinforcement of biosecurity to limit the disease spread.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea, Clinical parameters, Physio-pathogeny

La diarrhée épidémique porcine (DEP) a été décrite pour la première fois en Angleterre en 1971 (Oldman, 1972). Elle se manifeste par l'apparition de diarrhées liquides et de vomissements chez les porcelets mais également chez les animaux en engraissement. Les épizooties de DEP sont plus généralement observées l'hiver. La DEP ressemble au niveau clinique à la gastro-entérite transmissible (GET). Les deux maladies sont d'ailleurs toutes les deux causées par une infection par des alpha-coronavirus. Le virus de la diarrhée épidémique (vDEP) a été identifié en 1978, associé à des cas de diarrhée liquide et la souche isolée, appelée CV777, est considérée comme la souche européenne de référence (Chasey and Cartwright, 1978; Pensaert and de Bouck, 1978). Le vDEP diffère au niveau génomique et antigénique du virus de la GET. La souche CV777 a permis de reproduire expérimentalement les symptômes de DEP chez des porcelets sous la mère et chez des porcs en engraissement (Debouck and Pensaert, 1980).

En Amérique, à part quelques cas de DEP décrits au Canada dans les années 1980, les Etats-Unis et l'Amérique latine étaient indemnes de DEP jusqu'en 2013 (Rose and Grasland, 2014). Fin avril 2013, des premiers cas de DEP ont été observés aux Etats-Unis avec des taux de mortalité compris entre 95 et 100 % chez les porcelets sous la mère (Stevenson *et al.*, 2013). L'épizootie se maintient encore un an plus tard avec plus de 150 nouveaux élevages affectés par semaine. Vingt-neuf Etats et plus de 7 000 élevages ont été touchés, entraînant la mort de plus de cinq millions de porcs. Les souches isolées aux Etats-Unis ont montré 99,5 % d'homologie avec une souche isolée lors d'épisodes de DEP de sévérité singulière en Chine en 2012 (Huang *et al.*, 2013). L'épizootie s'est propagée au Canada en février 2014, atteignant l'Ontario principalement (58 élevages touchés au 10 mai 2014) mais aussi le Manitoba (4 élevages), le Québec (1 élevage) et l'île du Prince Edouard (1 élevage). Depuis le 22 janvier la DEP a progressé de façon relativement modérée (1 à 7 nouveaux cas par semaine) (<http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/les-eleveurs-fr/actualites.php>).

Des cas ont aussi été identifiés en Amérique centrale et du sud. C'est au Mexique que la situation semble la plus critique. Les autorités sanitaires mexicaines ont en effet fait une déclaration à l'OIE le 21 mai 2014 rapportant une épizootie ayant touché jusqu'ici quatre vingt trois élevages dans dix-sept Etats différents. Le début de l'épizootie est daté au 30 juillet 2013 et elle s'est propagée aux parties centrale et ouest du Pays. Les informations sont moins précises dans d'autres pays d'Amérique latine même si plusieurs importantes suspicions dans une dizaine d'élevages faisant face à une surmortalité associée à des vomissements et de fortes diarrhées dans différentes provinces en Colombie (Neiva, Huila, Cundinamarca et Meta) ont aujourd'hui fait l'objet d'une déclaration officielle à l'OIE.

La maladie a également été décrite en République dominicaine et la présence du vDEP confirmée sur l'île. Dix-sept élevages seraient touchés, impliquant la mort d'environ 8 500 porcs. La maladie est également apparue au Japon en octobre 2013 après sept ans d'absence. Depuis, 664 élevages ont été touchés dans trente-huit préfectures. L'évolution de l'incidence hebdomadaire au Japon depuis le début de l'épizootie présente des similitudes avec ce qui est observé aux Etats-Unis : après une première phase de décembre 2013 à janvier 2014 d'accroissement modéré de l'incidence puis de déclin dans la province de Kyusyu/Okinawa, un accroissement brutal et très rapide est observé début mars 2014, atteignant un pic épidémique de près de cent nouveaux cas hebdomadaires à la mi-avril. Si l'incidence reste assez stable sur la province initialement touchée de Kyusyu/Okinawa, l'augmentation de l'incidence globale semble être liée à une extension très rapide à d'autres régions (Tokai, Kanto et Tohoku principalement). Depuis la mi-avril 2014, l'incidence semble en diminution. La maladie est également présente dans plusieurs autres pays asiatiques :

- en Chine où la maladie était probablement présente de manière enzootique avant 2010 mais où une forme plus sévère et epizootique semble avoir émergé fin 2010 malgré l'utilisation courante de la vaccination dans ce pays (Li *et al.*, 2012),
- en Corée du Sud, le Korea Rural Economic Institute (KREI), estime que 19 % des élevages de porcs de Corée du Sud ont connu un épisode de DEP réduisant la production en porcelets de ces élevages de près de 25 %,

- au Vietnam où, des foyers émergents de DEP ont été confirmés dès le début 2009 par les examens nécropsiques et la réalisation de RT-PCR dans la plupart des provinces du Sud Vietnam (Do *et al.*, 2011).

Signes cliniques et lésions

Le principal signe clinique de la DEP est une diarrhée liquide parfois précédée de vomissements. Chez les animaux adultes, l'infection peut toutefois être sub-clinique ou provoquer uniquement des signes d'anorexie et de vomissement. Lors d'épizootie, les taux de mortalité peuvent varier de 50 % en moyenne jusqu'à 95-100 % chez les porcelets sous la mère comme lors de l'épizootie qui sévit actuellement en Amérique du Nord. Les porcelets sous la mère présentent des signes cliniques dans les 24-48h après l'infection et ce pendant 3 à 4 jours avant de mourir. Les animaux plus âgés récupèrent une semaine après l'apparition des signes cliniques. La durée d'une primo-infection dans un élevage dure de trois à dix semaines à l'échelon de l'élevage. Les lésions macroscopiques ont été décrites chez des animaux naturellement ou expérimentalement infectés (Coussement *et al.*, 1982; Ducatelle *et al.*, 1982; Jung *et al.*, 2014; Pospischil *et al.*, 1982). Les macro-lésions se concentrent au niveau du petit intestin, dont la paroi devient fine et transparente et dont le contenu est aqueux et de couleur jaunâtre (Stevenson *et al.*, 2013).

Reproduction de la maladie

La DEP a pu être reproduite expérimentalement peu de temps après l'identification de l'agent causal, sur des porcelets âgés de deux à dix-huit jours et inoculés par voie orale avec la souche européenne CV777 (Debouck *et al.*, 1981). Les porcelets ont présenté rapidement des signes cliniques entre 22 à 36h après inoculation. La réplication du virus a alors été démontrée dans les cellules épithéliales des villosités du petit intestin dès 12h post-inoculation, mais également au niveau du colon. Des résultats similaires ont été obtenus avec une souche américaine isolée en juin 2013 (Jung *et al.*, 2014). Des porcelets âgés de dix à trente-cinq jours ont été inoculés par voie oro-nasale ou orale avec $10^{6,3}$ à 10^9 copies équivalent-génome. Les porcelets ont commencé à excréter le virus dans les fèces dès 24h post-inoculation et tous les porcelets ont montré des signes cliniques sévères de diarrhée. Le virus a été détecté dans la totalité de l'intestin avec le jéjunum et l'iléon comme premiers sites d'infection. Tous les animaux ont également présenté une virémie jusqu'à $10^{7,6}$ copies équivalentes au génome/mL après l'apparition des signes cliniques.

Les anticorps contre le vDEP sont détectés entre deux à trois semaines après infection et peuvent persister plus de deux ans. Cependant la présence d'anticorps sériques n'est pas une preuve de protection. La protection vis-à-vis d'une réinfection est plutôt reflétée par la présence d'une immunité muco-sale intestinale qui est, elle, de courte durée (Pensaert, 1989). Les porcelets sont protégés par les anticorps maternels présents dans le colostrum jusqu'à l'âge de quatre à treize jours, la durée de l'immunité dépendant du titre sérologique de la mère (Song and Park, 2012). Après une primo-infection, des réinfections périodiques sont décrites dans certains élevages (Dufresne and Robbins, 2014) et peuvent avoir lieu dès cinq mois après le premier épisode de DEP et ce en présence d'anticorps chez les animaux (Pensaert, 1989).

Agent causal : structure

Le vDEP est un coronavirus, classé dans le genre *Alphacoronavirus*. Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN positif, simple brin de 28 kb environ. Le virus ne provoque pas de maladie chez l'Homme. Le virus peut être cultivé *in vitro* sur cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain) en présence de trypsinase dans le milieu de culture. Il reste néanmoins difficile à cultiver (Song and Park, 2012).

Le génome viral présente la structure commune à tous les coronavirus. Une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. L'ordre des gènes sont dans l'ordre canonique réplicase-S-E-M-N. La réplicase est codée par deux ORF, 1a et 1b. Le gène S code pour la protéine de spicule à la surface du virion, le gène E pour la protéine d'enveloppe, le gène M pour la protéine de matrice et le gène N pour la nucléocapside qui entoure et protège l'ARN viral (Masters, 2006). Le vDEP présente un ORF supplémentaire appelé ORF3, situé entre le gène S et E. Par analyse phylogénétique, en se basant sur les séquences des gènes S, M et ORF3, il est possible d'identifier différents clusters selon la région d'origine. Des formes plus virulentes ont été décrites en 2011 et 2012 en Chine. L'analyse phylogénétique conduite sur le génome complet des souches isolées aux États-Unis en mai 2013 sont proches d'une souche isolée en 2012 dans la province d'Anhui en Chine. Les souches américaines de vDEP présentent des insertions aux acides aminés 56 à 59 et 139 et une délétion des acides aminés 160 à 161 dans la protéine S par rapport à la souche européenne de référence CV777. Ces particularités sont également identifiées chez les souches de vDEP isolées récemment en Corée du Sud et en Chine (Huang *et al.*, 2013).

Transmission

Le vDEP se transmet essentiellement par voie oro-fécale entre porcs. L'épizootie au sein d'un élevage sensible survient quatre à cinq jours après l'introduction ou la vente de porcs. Le virus est ainsi probablement introduit en élevage *via* des porcs infectés ou par des vecteurs mécaniques (bottes, camions, etc.), soulignant l'importance des mesures de biosécurité et d'hygiène dans la prévention de l'introduction du vDEP en élevage. Le virus est susceptible de persister plus facilement sous une forme enzootique au sein de l'élevage après une première phase épizootique. Un cycle enzootique peut ainsi s'instaurer dans les élevages où le rythme de rotation est important et s'accompagne de mélanges de portées issues de bandes différentes et de statut immunitaire hétérogène.

Afin de déterminer la dose minimale infectante avec une souche de vDEP isolée aux États-Unis en 2013, des dilutions en série de 10 en 10 ont été réalisées à partir d'un homogénat clarifié de muqueuses d'intestin prélevées sur un porcelet affecté par la DEP. Ces dilutions ont ensuite été inoculées par voie oro-nasale à des porcelets de dix jours. Des signes cliniques de diarrhée ont été observés chez les porcelets ayant reçu les dilutions 10^{-2} à 10^{-8} . Aucun signe clinique n'a été relevé chez les animaux inoculés avec les dilutions 10^{-9} à 10^{-12} . Ces résultats indiquent que la dose infectieuse minimale du vDEP est très faible (Goyal, 2014). De plus, dans l'étude de reproduction expérimentale de la maladie où les animaux excrétaient du virus dès 24h post-inoculation, un porcelet avait été mis en contact indirect avec un porcelet inoculé par voie oro-nasale. Le porcelet a présenté des signes cliniques 2h après l'apparition des signes cliniques du porcelet inoculé et les mêmes charges génomiques dans les fèces et sérum. Ces résultats démontrent une transmission horizontale de porc à porc très efficace.

Une étude de transmission du virus par voie aérienne a été conduite à l'Université du Minnesota, USA, (http://www.cvm.umn.edu/sdec/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/@sdec/documents/content/cvm_content_474046.pdf). Dix porcelets de huit semaines d'âge ont été infectés par le vDEP. Des prélèvements d'air ont été réalisés pendant les trois premiers jours suivant l'infection dans les salles hébergeant les animaux. Tous les prélèvements se sont révélés positifs par RT-PCR en temps réel suggérant une possible transmission par voie aérienne. De plus, le génome viral a été détecté dans l'air jusqu'à 16km d'élevages infectés (Poulin *et al.*, 2013).

La transmission du virus par voie vénérienne n'est pas connue à l'heure actuelle. Elle est néanmoins possible puisqu'une phase de virémie est observée au moins lors de primo-infection. Elle est également postulée par analogie avec le virus de la bronchite infectieuse, un gamma-coronavirus aviaire, dont on a démontré la transmission à la poule *via* l'insémination avec du sperme de coq contaminé (Gallardo *et al.*, 2011). Cette hypothèse est également supportée par la détection de

génomique virale dans les semences provenant de verrats infectés dans un centre d'insémination artificielle affecté par la DEP (Dufresne and Robbins, 2014). Cependant la possibilité d'une contamination croisée par des fèces lors de la collecte ou la préparation de la semence ne peut être exclue.

Résistance du virus

Le vDEP est stable à 4°C de pH 5 à 9, et à 37°C de pH 6,5 à 7,5 (Pospischil *et al.*, 2002). Il apparaît donc que le virus peut survivre dans des conditions de pH assez larges à température basse. Les désinfectants efficaces vis-à-vis du vDEP sont ceux contenant du phénol, du peroxygène, du chlore et ceux contenant de l'ammonium quaternaire et du glutaraldéhyde.

La persistance du virus a été étudiée dans différentes matrices à différentes températures et à des taux d'humidité relative différents (Goyal, 2014). Des fèces frais de porcs ont étéensemencés avec du vDEP puis stockés à 40, 50 et 60°C avec des taux d'humidité variant de 30, 50 à 70 %. Le vDEP était toujours infectieux jusqu'à sept jours à ces températures. Dans du lisier, le virus a persisté pendant vingt-huit jours (derniers temps de stockage testés) aux températures de 4°C et -20°C et pendant quatorze jours à 25°C. Dans l'eau de boisson, du vDEP infectieux a été détecté après une semaine de stockage à température ambiante (25°C) mais pas au-delà d'une semaine. Dans l'aliment humide (soupe) conservée à température ambiante, l'ARN du vDEP n'était pas dégradé jusqu'à vingt-huit jours de stockage. Par contre dans l'aliment sec, le virus n'a persisté qu'une semaine.

De même la résistance du virus à différents traitements de temps et de température a été testée en utilisant une suspension de lisier contaminé déposée sur un support métallique, traitée puis prélevée pour inoculer des porcelets (Université de l'Iowa). Seuls les traitements à 71°C pendant dix minutes et à 20°C pendant sept jours n'ont pas abouti à l'infection de porcelets. Par contre, les traitements de 54 ou 62°C pendant dix minutes, de 37°C pendant 12h ou de 20°C pendant 24h, n'ont pas permis d'éliminer le virus infectieux.

Transmission du vDEP par voie alimentaire

L'agence canadienne de l'inspection alimentaire (Canadian Food Inspection Agency (CFIA)) a annoncé en février 2014 que de l'ARN du virus de DEP avait été détecté dans des échantillons de plasma de porc en provenance des Etats-Unis, qui entrait dans la composition d'aliment porcelet premier âge. Les résultats en RT-PCR temps réel présentaient des Ct de valeur comprise entre 30 et 33 équivalent à 10^2 - 10^3 particules virales infectieuses (Nitikanchana, 2014). Les lots d'aliments mis en cause ont été retirés du marché. L'agence canadienne a alors émis l'hypothèse que l'alimentation pouvait contribuer à véhiculer le virus. Un bio-essai a ensuite été réalisé à l'université du Minnesota au cours duquel des porcelets ont été inoculés avec du plasma positif en RT-PCR pour la présence de vDEP. Les animaux ont été infectés. Par contre, lorsque les granulés utilisés en alimentation (de l'ordre de 5 à 10% de plasma incorporé dans l'aliment (Gallois *et al.*, 2009) ont été distribués aux porcelets, aucun animal n'a présenté d'infection par le vDEP. Après le rappel des lots d'aliment pour porcelets et truies positifs pour la présence de vDEP, 190 sacs de plasma ont été prélevés et regroupés par dix pour être testés par RT-PCR temps réel. Les dix-neuf lots étaient positifs pour la présence d'ARN de vDEP. Les enquêtes réalisées par la suite en Ontario, Canada, sur les premiers élevages affectés par la DEP montrent que dix-huit de ces vingt premiers élevages étaient livrés par la même usine d'aliments ainsi que l'élevage atteint de DEP situé sur l'île du Prince Edouard.

Enfin, la possibilité de transmission du vDEP par voie alimentaire a été démontrée par un essai expérimental (Dee, 2014). Dans des élevages ayant des truies présentant des signes cliniques de DEP dans les 24 à 48h après la livraison d'aliments, des prélèvements ont été effectués dans les silos stockant l'aliment à l'aide de chiffonnettes. L'ARN viral a pu être mis en évidence dans ces

échantillons montrant que l'aliment pouvait être contaminé par le virus. L'aliment stocké dans les silos et positif pour la présence de vDEP a été mélangé à de l'aliment indemne de virus et utilisé en libre accès pour nourrir des porcelets en animalerie confinée. Les porcelets ont développé des signes cliniques de diarrhée et vomissement quatre jours après l'ingestion d'aliment. Ces travaux établissent que l'aliment peut être un véhicule d'introduction du vDEP dans des élevages indemnes.

Récemment, en mars 2014 aux Etats-Unis, un coronavirus différent du vDEP, appartenant au genre *Delta-coronavirus* a été isolé d'un élevage présentant une symptomatologie identique mais en l'absence d'autres agents pathogènes provoquant les mêmes signes cliniques (vDEP, vGET, rotavirus) et a diffusé assez largement dans la population porcine aux États-Unis (https://www.aasv.org/pedv/SECoV_weekly_report_140425.pdf). Cependant, un essai expérimental d'infection réalisé avec ce delta-coronavirus porcin (PDCoV) sur des porcelets de quatorze jours n'a pas permis de reproduire de signes cliniques ni de lésions, et aucun génome viral n'a pu être détecté par la suite dans les organes (University of Minnesota, http://www.cvm.umn.edu/sdec/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/@sdec/documents/content/cvm_content_477786.pdf). Le rôle et l'importance de ce virus dans l'épizootie actuelle de DEP restent à investiguer.

Conclusion

L'épizootie majeure de DEP qui sévit actuellement dans plusieurs parties du monde (Amérique du Nord, Amérique latine, République Dominicaine, Japon, Chine, Corée du Sud, Vietnam) témoigne de la pathogénicité élevée des nouveaux variants de vDEP isolés en Amérique du Nord, de l'efficacité et de la rapidité de leur transmission. Les données physio-pathologiques sur ce nouveau variant de vDEP mettent en évidence une pathogénicité beaucoup plus importante que les virus de DEP circulant en Europe dans les années 1980. Les données épidémiologiques issues des différents pays touchés suggèrent une phase initiale de contamination quasi-simultanée de plusieurs élevages géographiquement distants avec dans le cas du Canada un lien épidémiologique correspondant à une origine commune de l'alimentation des porcs des différents élevages touchés initialement. Ces caractéristiques sont à relier à l'identification avérée du virus dans des plasmas incorporés à l'alimentation des porcs et aux particularités de résistance importante à différents traitements physiques.

L'autre particularité majeure de ce virus est la très faible dose infectieuse nécessaire et une résistance accrue à température basse, ce qui suggère une facilité de transport mécanique du virus *via* des véhicules animés ou non (camions, bottes, ...) et donc les difficultés rencontrées quant à la maîtrise de sa propagation même dans un contexte d'application de mesures d'hygiène et de biosécurité strictes.

Enfin, compte-tenu d'une immunité vraisemblablement transitoire chez les reproducteurs et d'une protection du porcelet essentiellement locale due au transfert d'immunoglobulines de la mère au porcelet, il ne semble pas s'installer une immunité de troupeau suffisante pour prévenir la réinfection des élevages. Les rechutes observées aux Etats-Unis dans des élevages précédemment touchés peuvent en partie s'expliquer par ce phénomène, auquel s'ajoute vraisemblablement une augmentation progressive d'une sous-population de reproducteurs sensibles *via* le jeu du renouvellement du troupeau. Dans ces conditions, l'épizootie observée dans ces différents pays pourrait s'installer durablement sous une forme plus enzootique permanente. Au niveau européen, l'immunité de population vis-à-vis du vDEP est faible comme le démontre une enquête indiquant une séroprévalence de moins de 10 % au Royaume-Uni (<http://www.defra.gov.uk/ahvla-en/science/bact-food-safety/2013-pig-abattoir-study/>; D. Armstrong, BPEX). Au regard du risque de propagation du virus en France, la DEP vient d'être ajoutée à la liste des dangers sanitaires de

première catégorie pour les espèces animales faisant l'objet d'une émergence, en annexe I.b de l'arrêté du 29 juillet 2013. Cette décision a pour conséquence de rendre obligatoire la déclaration de tout cas apparaissant sur le sol français.

Références bibliographiques

- Chasey, D., Cartwright, S.F., 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 25, 255-256.
- Coussement, W., Ducatelle, R., Debouck, P., Hoorens, J., 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet. Pathol.* 19, 46-56.
- Debouck, P., Pensaert, M., 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet. Res.* 41, 219-223.
- Debouck, P., Pensaert, M., Coussement, W., 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by the coronavirus-like agent CV777. *Vet. Microbiol.* 6, 157-165.
- Dee, S., 2014. Transmission of PEDV via feed: proof of concept.
- Do, T.D., Nguyen, T.T., Suphasawatt, P., Roongroje, T., 2011. Genetic Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Isolates from Southern Vietnam during 2009-2010. *Thai J Vet. Med.* 41, 55-64.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P., Hoorens, J., 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet. Pathol.* 19, 57-66.
- Dufresne, L., Robbins, R. 2014. Field experience with porcine epidemic diarrhea. In: 2014 annual meeting of the American association of swine veterinarians, Dallas, Texas, USA, 1-4 March 2014, 613.
- Gallardo, R.A., Hoerr, F.J., Berry, W.D., van Santen, V.L., Toro, H., 2011. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. *Avian Dis.* 55, 255-258.
- Gallois, M., Rothkotter, H.J., Bailey, M., Stokes, C.R., Oswald, I.P., 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal* 3, 1644-1661.
- Goyal, S., 2014. PEDV research updates: Environmental stability of PED (porcine epidemic diarrhea virus). University of Minnesota, US National Pork Board.
- Huang, Y.W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4, e00737-00713.
- Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K.A., Lu, Z., Zhang, Y., Saif, L.J., 2014. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerg. Inf. Dis.* 20, 662-665.
- Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., Tang, X., He, Q., 2012. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg. Inf. Dis.* 18, 1350-1353.
- Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research* 66, 193-292.
- Nitikanchana, S., 2014. Potential Alternatives to Reduce Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Contamination in Feed Ingredients, Kansa State Applied Swine Nutrition, Draft February 26, 2014.
- Oldman, J., 1972. Letter to the editor. *Pig farming Supplement* Oct, 72-73.
- Pensaert, M. 1989. Porcine epidemic diarrhea virus, In: Pensaert, M. (Ed.) *Virus infections of porcines*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 167-176.
- Pensaert, M.B., de Bouck, P., 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58, 243-247.
- Pospischil, A., Hess, R.G., Bachmann, P.A., 1982. Morphology of intestinal changes in pigs experimentally infected with porcine rota-virus and two porcine corona viruses. *Scand. J Gastroenterol.. Supplement* 74, 167-169.

- Pospischil, A., Stuedli, A., Kiupel, M., 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *J. Swine Health Prod.* 10, 81-85.
- Poulin, M.C., Klopfenstein, C., Morin, M., 2013. Evaluation et gestion du risque d'introduction et de dispersion de la diarrhée épidémique porcine (DEP) au Québec. 1-70.
- Rose, N., Grasland, B., 2014. Brève: Epizootie de diarrhée épidémique porcine (DEP) aux États-Unis et au Canada : question sur une éventuelle origine alimentaire. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.*, 18.
- Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus genes* 44, 167-175.
- Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., Burrough, E.R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V.L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B.J., Koster, L.G., Killian, M.L., Yoon, K.J., 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25, 649-654.