

IL LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL) NEL SUINO: DUE TECNICHE A CONFRONTO E NUOVE PROPOSTE PER UN CONCRETO UTILIZZO DI CAMPO

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE (BAL) IN SWINE: TWO TECHNIQUES IN COMPARISON AND NEW PROPOSALS FOR CONCRETE FIELD EMPLOYMENT

SCOLLO, A.¹, MAZZONI, C.², TONON, F.², BORRI, E.², RAFFI, V.², DONNA, R.²,
GHERPELLI, M.²

¹Dipartimento di Scienze Animali, Università di Padova;

scollo@suiwet.it

²Veterinario libero professionista Suiwet.

Parole chiave: Lavaggio broncoalveolare, patogeni respiratori, suino

Key words: Bronchoalveolar lavage, respiratory pathogens, swine

Riassunto. Scopo del presente lavoro è descrivere e confrontare due tecniche di BAL che non prevedono l'anestesia del soggetto né l'utilizzo di un broncoscopio a fibre ottiche, discutendo gli ambiti più promettenti per l'impiego dell'indagine in condizioni di campo. Sono rientrati nella prova 85 suini, di cui 72 sani all'esame clinico, di ceppo genetico danese e di circa 50 kg/capo di peso medio all'inizio della prova. Gli altri 13 suini, provenienti da altri allevamenti, manifestavano una sindrome respiratoria più o meno intensa. I 72 soggetti sani sono stati sottoposti al BAL in sei giornate di prova, distribuite nell'arco di due mesi. In ogni giornata di prova, su ciascun soggetto sono state praticate due tecniche diverse di BAL: la via nasale e la via orale. I 13 suini con sindrome respiratoria invece sono stati sottoposti ad un unico BAL per via nasale ed a concomitante prelievo di sangue dalla vena giugulare a scopo diagnostico. La via orale è risultata essere decisamente più idonea tra le due tecniche, dimostrandosi agevole per l'operatore e poco invasiva per l'animale. L'isolamento di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2 e virus influenzali con PCR sul BALF suggerisce buone prospettive per l'impiego di campo della tecnica quale metodo di indagine molto sensibile e pratico, che consente un tempestivo monitoraggio dei processi infettivi quando affiancata agli attuali mezzi diagnostici.

Abstract. Aim of the study is to describe and compare two BAL techniques without anaesthesia and fiberoptic bronchoscope, discussing the most promising areas of investigation for its use in field conditions. The was carried out in 85 pigs, of which 72 healthy on clinical examination, Danish genetic and average weight about 50 kg/head at the beginning of the trial. The other 13 pigs from other farms, showed a respiratory syndrome. The 72 healthy animals were submitted to BAL in six days, spread into two months. In each test day, each pig have been carried out two different techniques of BAL: the nasal route and the oral route. The 13 pigs with respiratory syndrome instead have been carried out a single BAL by nasal route and concomitant blood collection from the jugular vein for diagnostic purposes. The oral route is found to be better than the nasal route, easier for the operator and less invasive for the animal. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, PCV2 and influenza viruses with PCR on BALF

suggests good prospects for use of BAL in field conditions as a sensitive and practical method of investigation, allowing for rapid monitoring of infectious processes when accompanied with the current diagnosis.

INTRODUZIONE

Il lavaggio broncoalveolare (BAL) è una procedura di indagine che permette di ottenere materiale (fluido bronco-alveolare) proveniente dalle basse vie respiratorie a scopo diagnostico. Negli ultimi decenni ha acquisito sempre più rilevanza sia in medicina umana che in veterinaria, grazie soprattutto all'avvento della broncoscopia con endoscopio a fibre ottiche che ha permesso una più facile introduzione del catetere nel tratto respiratorio profondo (Ganter and Hensel, 1997).

Il fluido bronco-alveolare ottenuto dal BAL (BALF) è stato oggetto di studi citologici, biochimici e batteriologici nella specie suina, che hanno permesso di descrivere la microflora batterica presente normalmente nel tratto respiratorio (Hensel et al., 1994) e di stabilire dei valori di riferimento per la conta cellulare ottenuta da soggetti sani (Ganter and Hensel, 1997). Ganter et al. (1993) descrivono il BAL come un buon metodo di diagnosi eziologica per le patologie polmonari e diversi autori lo utilizzano per l'isolamento di *Mycoplasma hyopneumoniae* dal polmone (Abiven and Pommier, 1993) e nello studio della risposta immunitaria locale a seguito di vaccinazione per via respiratoria con ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hensel et al., 1996), *Pasteurella multocida* (Kohler et al., 1997) e virus influenzali (Charley et al., 1980). Recentemente, Moorkamp et al. (2008) hanno comparato la presenza dei più comuni agenti batterici nel BALF e nel tessuto polmonare dello stesso animale dopo necropsia, concludendo che il BAL rappresenta un metodo appropriato per l'isolamento dei patogeni respiratori.

Le tecniche utilizzate per il prelievo di materiale dall'albero respiratorio si sono evolute nel tempo. I primi studi sperimentali che prevedevano l'impiego del BAL nel suino risalgono agli anni '70, dapprima effettuati su polmoni isolati dopo la macellazione (Mensik et al., 1971) e pochi anni dopo sugli animali in anestesia mediante inserimento di una cannula per via transtracheale (Williams, 1978). Entrambi questi metodi presentano però seri limiti: nel primo caso, l'impossibilità di seguire l'evoluzione delle infezioni/malattie *in vivo*; nel secondo, l'incisione dei tessuti per avere accesso alla trachea rappresenta sicuramente una tecnica invasiva, difficoltosa e a rischio di contaminazione del campione (Charley et al., 1980). Per questi motivi, a tutt'oggi la tecnica più utilizzata è quella che prevede l'anestesia del suino e l'introduzione per via orale di una sonda tracheale a fibre ottiche (Rudolph et al., 2009). Tuttavia, mentre nelle altre specie di interesse veterinario questa tecnica è ampiamente utilizzata, nel suino il BAL ha trovato impiego quasi esclusivamente in campo sperimentale, sia per la necessità di osservare rigide regole di biosicurezza con un'attrezzatura come il broncoscopio (Moorkamp et al., 2008), sia perché il rischio ed il costo legati all'anestesia dell'animale rendono l'indagine poco proponibile.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere e mettere a confronto due tecniche di BAL che non prevedono l'anestesia del soggetto né l'utilizzo di un broncoscopio a fibre ottiche, grazie all'utilizzo di sonde monouso e all'adozione di manualità semplici e non eccessivamente traumatiche per l'animale. Inoltre, sulla base delle prime esperienze maturate dagli autori, si discutono gli ambiti più promettenti per l'impiego del BAL in condizioni di campo, con l'obiettivo di integrare e migliorare gli attuali mezzi di indagine delle infezioni/malattie respiratorie, che sempre più richiedono strategie di prevenzione e tempestività di diagnosi per consentire l'abbattimento dei costi sanitari.

MATERIALI E METODI

Sono rientrati nella prova 85 suini appartenenti a differenti condizioni di campo. Settantadue soggetti provenienti da un unico allevamento risultavano sani all'esame clinico, erano di ceppo genetico danese e di circa 50 kg/capo di peso medio all'inizio della prova. Gli altri 13 suini invece, provenienti da altri allevamenti, manifestavano una sindrome respiratoria più o meno intensa. Tre di loro, di ceppo genetico olandese, si trovavano nello stesso sito di ingrasso e pesavano circa 80 kg/capo, mentre i restanti 10 erano scrofette in accrescimento (5 di ceppo genetico olandese e 5 di ceppo genetico inglese) provenienti da 2 nuclei di moltiplicazione. I 72 soggetti sani sono stati sottoposti al BAL da quattro operatori in sei diverse giornate di prova, distribuite nell'arco di due mesi ad intervalli di circa 10 giorni l'una dall'altra. In ogni giornata di prova, su ciascun soggetto sono state praticate due tecniche diverse di BAL: la via nasale (Abiven and Pommier, 1993) e la via orale (Marchant and Muller, comunicazione personale, 2010). L'ultima giornata di prova è stata effettuata ad un peso medio degli animali di circa 80 kg/capo. I 13 suini con sindrome respiratoria invece sono stati sottoposti ad un unico BAL per via nasale ed a concomitante prelievo di sangue dalla vena giugulare a scopo diagnostico.

Tecniche di lavaggio broncoalveolare

Entrambe le tecniche di BAL sono state effettuate sugli animali *in vivo* senza l'ausilio di alcuna anestesia (Figure 1-2). Il mezzo di contenzione utilizzato è stato un torcinaso serrato attorno alla mascella il più caudalmente possibile. L'estremità libera del torcinaso è stata fissata ad un gancio in posizione sopraelevata in modo da ottenere un'estensione moderata del collo dell'animale, la cui testa è stata mantenuta allineata con l'asse del corpo.

Accesso al polmone per via nasale

È stato utilizzato per il prelievo un catetere di 90 cm di lunghezza e 1,9 mm di diametro (Compipath® Vétérinaire). Dopo la pulizia del grugno, il catetere è stato introdotto in una delle due narici mantenendolo il più medialmente possibile lungo il setto nasale e introducendolo in profondità ad ogni atto inspiratorio dell'animale per facilitarne l'entrata in trachea. La sonda è stata bloccata alla comparsa della tosse, che ne ha indicato l'arrivo nelle vie aeree profonde. La prova dell'entrata in trachea era rappresentata dall'appannamento del catetere durante gli atti respiratori.

Accesso al polmone per via orale

Per mantenere aperta la bocca dell'animale è stato utilizzato un apribocca convenzionale. Si è fatto uso di due cateteri: una guida sterile della lunghezza di 53 cm (Unomedical®) ed un catetere sonda più lungo e sottile, della lunghezza di 90 cm e di 1,9 mm di diametro (Compipath® Vétérinaire). Dopo l'apertura della bocca, il catetere guida è stato inserito per la sua intera lunghezza in cavità orale lungo il rafe mediano del palato duro, mantenendolo il più dorsale possibile e parallelo all'asse dell'animale per facilitarne l'entrata in trachea. La sua introduzione in profondità è avvenuta durante gli atti inspiratori. La seconda sonda è stata quindi inserita all'interno della guida, che ne ha permesso un facile superamento della laringe. La sonda è stata bloccata alla comparsa della tosse, che ne ha indicato l'arrivo nelle vie aeree profonde. La prova dell'entrata in trachea era rappresentata dal cambio del timbro di voce dell'animale al passaggio della sonda guida attraverso la laringe e dall'appannamento del catetere durante gli atti respiratori.

Figura 1. BAL per via nasale (a sinistra) e per via orale (a destra).
Figure 1. BAL by nasal route (on the left) and by oral route (on the right).

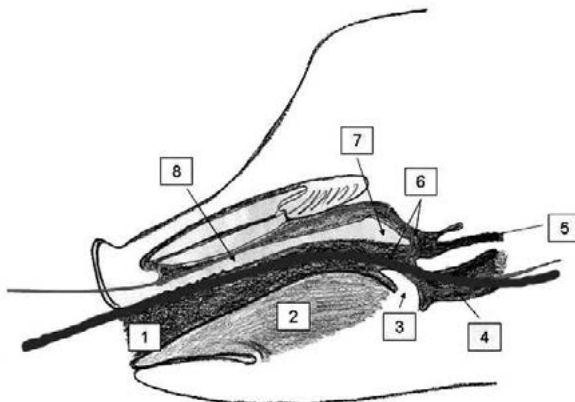


In entrambe le tecniche, dopo il raggiungimento delle vie aeree profonde è stata collegata al catetere una siringa sterile da 20 ml contenente 15 ml di soluzione fisiologica isotonica sterile e l'equivalente di 5 mL di aria. L'iniezione dell'aria avveniva immediatamente dopo il rapido inserimento della soluzione fisiologica all'interno del polmone, allo scopo di svuotare il catetere ed avere la certezza di aspirare liquido venuto a contatto con il parenchima respiratorio. È seguita una immediata aspirazione di 2-5 mL di BALF con suo stoccaggio in provette sterili. In caso di difficoltà di recupero del BALF dal polmone si è provveduto ad una nuova iniezione di 10 mL di soluzione fisiologica sterile attraverso il catetere, ripetendo poi l'operazione di aspirazione.

Figura 2. Sezione sagittale destra della testa di suino. Percorso del catetere per via nasale (linea rossa) e per via orale (linea blu).

1 Cavità orale; 2 Lingua; 3 Epiglottide; 4 Cavità laringea; 5 Esofago; 6 Cavità faringea; 7 Palato molle; 8 Palato duro.

Figure 2. Right sagittal plane of pig head. Nasal route (red line) and oral route (blue line).
 1 Oral cavity; 2 Tongue; 3 Epiglottis; 4 Larynx cavity; 5 Esophagus; 6 Pharynx cavity; 7 Soft palate; 8 Hard palate.



Analisi di laboratorio

Il BALF ed il siero ottenuti dai 13 suini con sindrome respiratoria sono stati sottoposti, sotto forma di due rispettivi pool per ciascuna azienda, alla ricerca mediante PCR di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2, virus influenzali (H1N1 e H3N2) e virus della malattia di Aujeszky. Inoltre su tutti i campioni di BALF è stato effettuato un esame batteriologico.

RISULTATI

Tecniche di lavaggio broncoalveolare

In nessuno dei circa 900 prelievi effettuati nel corso della prova si sono osservate nei suini reazioni indesiderate, a partire dalla morte per arrivare a stati di choc a seguito della manualità di preparazione dei soggetti e di esecuzione del prelievo. In cinque casi si è riscontrata la presenza di emazie nel BALF, senza peraltro poter registrare in seguito alcun segnale di malessere negli animali.

Accesso al polmone per via nasale

Il BAL eseguito per via nasale ha richiesto la manualità di un unico operatore e di un solo catetere. Il tempo impiegato per ciascun prelievo è stato di 5-15 minuti a seconda dell'indole del suino, compreso il tempo necessario al contenimento dell'animale. Il percorso della sonda lungo l'intero tratto respiratorio esterno ha frequentemente provocato negli animali lievi reazioni di intolleranza come starnuti, colpi di tosse, spostamenti della testa e lacrimazione oculare. Con altrettanta frequenza, a seguito di starnuti e colpi di tosse il catetere si è piegato all'interno delle vie nasali ostruendosi e rendendo vano il tentativo di prelievo. Inoltre, gli operatori hanno riportato all'unanimità una maggior difficoltà nell'effettuare il prelievo nei 72 suini di ceppo genetico danese durante la prima metà del ciclo di ingrasso. Il catetere infatti entrava spesso in esofago piuttosto che in trachea, rendendo impossibile il prelievo del BALF. In questi soggetti, nessun prelievo effettuato all'inizio del ciclo di ingrasso (circa 50 kg/pv) ha avuto esito positivo al primo tentativo. Tale difficoltà si è risolta gradualmente con l'aumentare del peso degli animali mentre si è verificata solo sporadicamente nei restanti 13 animali di diverso ceppo genetico. Una panoramica sulle principali caratteristiche della tecnica del BAL per via nasale è illustrata nella Tabella 1.

Accesso al polmone per via orale

Il BAL eseguito per via orale ha richiesto la manualità di due operatori e di due cateteri. Il tempo impiegato per ciascun prelievo è stato di 5-15 minuti a seconda dell'indole del suino, compreso il tempo necessario al contenimento dell'animale. Non si sono verificate reazioni di intolleranza al passaggio del catetere attraverso le vie respiratorie, tranne sporadici colpi di tosse al superamento della laringe, ed entrambe le sonde hanno mostrato ostruzioni da piegamento solo saltuariamente. Inoltre, tutti gli operatori hanno riportato una notevole facilità nell'esecuzione del prelievo anche prima di acquisire una buona manualità dovuta all'esperienza indipendentemente dal ceppo genetico e dal peso dei suini testati. Una panoramica sulle principali caratteristiche della tecnica del BAL per via orale è illustrata nella Tabella 1.

Tabella 1. *Caratteristiche del BAL per via nasale e per via orale a confronto.*
Table 1. *Comparison of BAL characteristics from nasal route and oral route.*

		Via nasale	Via orale		
PRO		Minore impiego di manodopera: 1 operatore.	Maggiore impiego di manodopera: 2 operatori.	CONTRO	
		Minore impiego di materiale: 1 catetere.	Maggiore impiego di materiale: 2 cateteri, 1 apribocca.		
CONTRO		Frequenti lievi reazioni di intolleranza al passaggio del catetere nell'intero tratto respiratorio esterno: starnuti, colpi di tosse, spostamenti della testa e lacrimazione oculare.	Sporadici colpi di tosse al passaggio del catetere attraverso la laringe.	PRO	
		Frequente ostruzione del catetere per piegamento.	Rara ostruzione per piegamento di entrambi i cateteri.		
		Elevata difficoltà di riuscita in suini di genetica danese di giovane età.	Elevata facilità di riuscita in tutte le genetiche ed a tutte le età.		

Analisi di laboratorio

I risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio dei pool di BALF e siero provenienti dai 13 suini con sindrome respiratoria sono riportati in Tabella 2. Nei pool dell'azienda A e B si è verificata una discordanza tra i risultati ottenuti dall'analisi del BALF (positivo) e del siero (negativo) per quanto riguarda la ricerca di PRRSv.

Tabella 2. *Risultati delle analisi di laboratorio ottenute con PCR su BALF e siero e con esame batteriologico su BALF.*

Table 2. *Results of lab analysis obtained from PCR on BALF and serum and from bacteriologic exam on BALF.*

Azienda	Unità	Prelievo	N° campioni	<i>M. Hyo.</i>	PRRS	PCV2	Influenza	Aujesky	Batteriologico
A	Ingrasso	BALF	3	Pos.	Pos.	-	-	-	Gen. <i>Streptococcus</i>
		Siero	3	-	Neg.	Neg.	-	-	
B	Scrofaia	BALF	5	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg	<i>Pasteurella multocida</i>
		Siero	5	-	Neg.	Neg.	-	-	
C	Scrofaia	BALF	5	Pos.	Neg.	1100 copie	Neg.	Neg.	Neg.
		Siero	5	-	Neg.	15000 copie	-	-	

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti, il BAL effettuato nell'animale non anestetizzato e senza l'ausilio di un broncoscopio a fibre ottiche è una tecnica di indagine che si presenta economica, agevole per l'operatore e poco invasiva per l'animale. L'assenza di apparenti stati reattivi o di sofferenza nei suini già nell'immediato post-prelievo conferma quanto riscontrato da Abiven e Pommier (1993), che all'autopsia a seguito di BAL non trovarono alcuna lesione alle vie respiratorie. Inoltre, l'utilizzo di cateteri monouso consente di praticare le buone norme di biosicurezza sempre più indispensabili nel settore suinicolo.

Sebbene il BAL sia un prelievo molto localizzato e potenzialmente non rappresentativo dell'intero polmone (Reinhold et al., 2005), Moorkamp et al. (2008) affermano che un esame batteriologico ottenuto dal BALF, proveniente per lo più da un lobo polmonare caudale, è comparabile alle analisi del tessuto polmonare *in toto* e di tamponi bronchiali prelevati dai lobi craniali e medi con il grande vantaggio di poter essere eseguito sull'animale *in vivo*.

Entrambe le tecniche, quella per via nasale e quella per via orale, si sono dimostrate facilmente praticabili in campo, ma la via orale è risultata essere decisamente più idonea in talune condizioni. Malgrado necessità di maggior personale e di più materiale, non ha presentato infatti alcuna limitazione legata alla conformazione anatomica delle diverse linee genetiche o alla differente età degli animali. Al contrario, la via nasale è risultata essere di difficile approccio nei suini di ceppo genetico danese tra i 50-70 kg circa, nei quali la sonda si dirigeva con molta più probabilità verso l'esofago piuttosto che verso la trachea. È possibile che esistano lievi differenze anatomiche tra una linea genetica e l'altra che rendono il tragitto compreso tra le narici e la trachea meno lineare ed accessibile nei suini di questa linea genetica. Si ipotizza che ad ostacolare la sonda a livello di laringe possano essere una diversa conformazione della cartilagine aritenoidica od una maggiore estensione del palato molle.

Le analisi di laboratorio sul BALF tramite PCR hanno consentito l'isolamento di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2 e virus influenzali. In due casi, i risultati ottenuti dalle diverse matrici biologiche dello stesso animale sono risultati discordanti, indicando una positività al PRRSv per il BALF ed una negatività per il siero. Tale risultato può fornire delle informazioni temporali sul processo infettivo eventualmente in atto, rilevanti sia dal punto di vista epidemiologico che clinico. Uno studio recente nell'uomo (Gidaris et al., 2010) suggerisce l'utilizzo del BAL per la diagnosi precoce di flogosi respiratoria tramite la misurazione dei valori leucocitari e di quelli di alcune citochine presenti nel BALF. Nelle condizioni di campo dell'allevamento suinicolo, il confronto e l'interpretazione dei risultati ottenuti dal BALF e dal siero provenienti dagli stessi animali potrebbe consentire di monitorare il processo infettivo con informazioni epidemiologiche di grande tempestività.

La comparazione tra le due matrici biologiche (BALF e siero) potrebbe fornire, almeno in alcune importanti malattie respiratorie del suino, informazioni diagnostiche più complete e tempestive, consentendo, nei casi in cui non fossero disponibili polmoni da cadaveri o da animali sacrificati, di evitare un secondo controllo sierologico in fase convalescente, abbreviando così i tempi di intervento terapeutico mirato.

La eventuale maggior sensibilità del BALF rispetto al siero nei confronti di PRRSv (da valutare in futuro su un campione più vasto) o la sua capacità di evidenziare il virus nelle vie respiratorie anche dopo la fine della fase viremica, potrebbe modificare l'approccio manageriale riguardo all'introduzione della rimonta nei siti di riproduzione.

Dai dati di laboratorio disponibili sinora si evidenzia una costante positività del BALF per *Mycoplasma Hyopneumoniae*. L'individuazione del microrganismo *in vivo* è generalmente effettuata tramite PCR su tamponi nasali, ma studi sperimentali suggeriscono che i siti di campionamento ottimali si trovano nelle parti più profonde del tratto respiratorio (Fablet, 2011). Il BAL potrebbe dunque rappresentare un metodo di indagine molto sensibile e pratico da affiancare agli attuali mezzi diagnostici.

BIBLIOGRAFIA

ABIVEN P., POMMIER P. (1993) Technique de lavage tracheobronchique par voie transnasale pour la detection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié. *Veterinary Research* 24, 515–522.

CHARLEY B., FRENOVE B. & VILLIERS P. (1980) Description et efficacité d'une méthode modifiée de lavage pulmonaire chez le porc anaesthésié. *Annual de la Recherche Veterinaire* 11, 209-213.

FABLET C., MAROIS C., DORENLOR V., EONO F., EVENO E., POEZEVARA T., KOBISCH M., MADEC F., ROSE N., 2011. Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant. *JRP* 2011, in pressing.

GANTER M., HENSEL A. (1997) Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. *Research in Veterinary Science* 1997, 63, 215-217.

GANTER M., KIPPER S., SCHOTTGER-WEGENER H., BECKMANN G. & BUNKA S. (1993) Diagnosis of pneumonitis in living pigs by bronchoalveolar lavage. *Berliner & Munchner Tierarztliche Wochenschrift* 1116, 330-333.

GIDARIS D., KANAKOUDI - TSAKALIDOU F., PAPAKOSTA D., TZIMOULI V., TAPARKOU A., VENTOURI M., TSANAKAS I., 2010. Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non inflammatory lung disease. *Hippokratia* 2010, 14, 2: 109-114.

HENSEL A., GANTER M., KIPPER S., KREHON S., WITTENBRINK M. M. & PETZOLD K. (1994) Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1697-1702.

HENSEL A., VAN LEENGOED L. A. M. G., SZOSTAK M., WINDT H., WEISSENBOCK J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., KATINGER A., STADLER M., GANTER M., BUNKA S., PABST R. & LUBITZ W. (1996) Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *Journal of Biotechnology* 44, 171-181.

KOHLER H., LEMSER B., MULLER G., SAALMULLER A. (1997) Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58 (1997) 277-286.

MARCHANT D., MULLER V., 2010. Tecnica di Lavaggio Bronco Alveolare per via orale. *Clinique Reseau Cristal*, comunicazione personale.

MENSIK J., FRANZ J., POSPISIL Z., KREJCI J. (1971) The local role of antibodies in the protection of calves and piglets against viral respiratory infections. *Acta Vet.*, suppl. 2, 75-81.

MOORKAMP L., NATHUES H., SPERGERSER J., TEGELER R., GROSSE BEILAGE E. (2008) Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *The Veterinary Journal* 175, 273–275.

REINHOLD P., COSTABEL U., HAMACHER J., THEEGARTEN D., GANTER M., ROSENBRUCH M., 2005. Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier. *Pneumologie* 59, 485–501.

RUDOLPH A., MARKSTALLER K., GAST K. K., DAVID M., SCHREIBER W. G. and EBERLE B. (2009) Visualization of alveolar recruitment in a porcine model of unilateral lung lavage using ³He-MRI. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53: 1310–1316.

WILLIAMS P.P., (1978) Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy - derived pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 485-489.