

CONFRONTO TRA DIFFERENTI MATRICI BIOLOGICHE PER LA DIAGNOSI DI PRRS DURANTE UN FOCOLAIO IN SUINI ALL'INGRASSO

COMPARISON OF DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES FOR THE DIAGNOSIS OF PRRS DURING AN OUTBREAK IN FATTENING PIGS

MARRO S.¹, GORIA M.², VITALE N.², MICELI I.², MONNIER M.², ZOPPI S.²,
DONDO A.², FACCENDA M.³

¹ Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Università di Torino;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta di Torino;

³ Medico Veterinario libero-professionista, Busca (CN)

Parole chiave: PRRSV, tampone bronchiale, tampone nasale, fluidi orali, lavaggio bronco-alveolare, PCR

Key words: PRRSV, oral fluids, bronchoalveolar lavage, bronchial swab, nasal swab, PCR

Riassunto

Uno dei passaggi più critici per il controllo della PRRS nell'allevamento suino è rappresentato dalla identificazione affidabile del virus negli animali di nuova introduzione, come le scrofette da rimonta.

In questo lavoro, al fine di identificare tutti gli animali portatori/eliminanti di PRRSv, è stata eseguita la ricerca del virus attraverso RT-nested PCR a partire da differenti matrici biologiche, quali siero, tampone nasale, tampone bronchiale, liquido di lavaggio bronco-alveolare e fluidi orali.

Scopo principale del presente studio è stato confrontare diverse matrici biologiche prelevate in suini in fase di magronaggio-ingrasso in un focolaio di PRRS al fine di valutare quale di esse consenta di rilevare con maggiore affidabilità la presenza di PRRSv.

Abstract

One of the most critical aspects for controlling PRRS in swine herds is represented by the reliable detection of the virus both in newly introduced animals and in the replacement of gilts. In this work RT-nested PCR technique was carried out in order to identify carrier animals. PCR detection was applied on different biological specimens: serum, bronchoalveolar flushing, oral fluid, nasal and bronchial swab were considered as useful matrices for PRRSv detection. This study was aimed to compare reliability of each kind of these specimens to detect, by mean of RT-PCR, the presence of PRRSv in a fattenig pig unit during an outbreak of PRRS.

INTRODUZIONE

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS) è uno tra gli agenti patogeni più diffusi negli allevamenti suini di tutto il mondo, responsabile di una sindrome riproduttiva e respiratoria che causa gravi danni ad impatto sanitario ed economico. Nonostante siano passati più di venti anni dalla comparsa di questo virus, le conoscenze su alcuni aspetti essenziali, quali patogenesi, risposta immunitaria ed epidemiologia, appaiono ancora spesso incomplete. Data l'eterogeneità dei ceppi circolanti, la scarsa cross-protezione verso ceppi eterologhi e la limitata efficacia dei vaccini attualmente disponibili, gli strumenti più validi

per il controllo della PRRS negli allevamenti da riproduzione sono comunemente considerati l'adozione di rigide misure di biosicurezza interne ed esterne, l'adeguata gestione del *pig-flow* nell'allevamento e l'acclimatamento dei riproduttori. L'obiettivo è quello di impedire l'entrata di un nuovo ceppo virale dall'esterno, preservare la stabilità aziendale limitando la circolazione virale nell'allevamento e promuovere l'instaurarsi di una immunità protettiva nei confronti del ceppo di campo; nonché, ovviamente, mantenere lo status di negatività in un allevamento *free*. In tale contesto il passaggio più critico consiste nell'identificare gli animali di nuova introduzione portatori e/o eliminatori di PRRSv.

Nei controlli di routine la matrice più frequentemente utilizzata per la diagnosi di PRRS, attraverso la ricerca degli anticorpi e del virus, è il siero, poiché è facile da prelevare ed è considerata economica e versatile, in quanto utilizzata anche per altre analisi.

Il siero, su cui viene applicata la RT-nested PCR (RT-PCR) per evidenziare precocemente l'infezione in fase viremica dell'animale, frequentemente può falsare la diagnosi (Duihnof *et al.*, 2011). È per questo motivo che può essere utile valutare e confrontate le prestazioni di altre matrici biologiche, quali saliva, tampone bronchiale, tampone nasale e fluido di lavaggio bronco-alveolare (BALF), al fine di migliorare l'efficacia del protocollo diagnostico applicato per evidenziare la presenza del virus negli animali al momento della loro introduzione in allevamento.

MATERIALI E METODI

Gli animali campionati per questo studio provenivano tutti da un sito 3 che ospita fino a 4000 suini per ciclo, suddivisi in 6 capannoni, in regime di TP/TV. In tale allevamento la circolazione virale di PRRS era comprovata dalla storia anamnestica delle madri dei soggetti campionati (scrofaia non indenne da PRRS), dalla sintomatologia e dalla viremia già rilevata con RT-PCR nel gruppo di suini durante i giorni della loro permanenza nel sito 2 precedenti il ristallo. La scelta di un allevamento con tali caratteristiche era stata motivata dalla necessità di reperire un numero significativo di animali naturalmente esposti all'infezione.

Lo studio è stato condotto su un campione casuale di 35 suini di genetica commerciale, identificati in modo univoco e stabulati in 7 box diversi, ma adiacenti. La numerosità campionaria è stata definita in questo modo per consentire di ottenere un limite inferiore dell'IC95% pari a 75%, per una sensibilità diagnostica attesa pari a 95%, con un errore di $\pm 5\%$.

Tutti gli animali sono stati seguiti in un *follow up* di 10 settimane (da novembre a gennaio) e sono stati sottoposti ai campionamenti di siero, tampone nasale, tampone bronchiale, BALF e fluidi orali con intervalli di 2 settimane l'uno dall'altro (6 sedute di campionamento in totale).

Gli animali, introdotti nel sito 3 a circa 10 settimane di età, sono stati sottoposti al primo campionamento (T1) a circa 12 settimane di età e peso medio di 30 Kg, risultando tutti provvisti di immunoglobuline specifiche per PRRSv. Al termine dello studio (T6) i capi avevano 22 settimane e peso medio di 80 Kg.

Modalità di prelievo dei campioni

Ciascun animale è stato adeguatamente contenuto attraverso l'utilizzo di uno stringimascella ad asta rigida e sottoposto al prelievo di sangue. In successione, si è provveduto a effettuare il tampone nasale e, con l'utilizzo di apposito morso apribocca, il tampone bronchiale, il lavaggio bronco-alveolare (BAL) e il prelievo del fluido salivare.

Il tampone bronchiale è stato effettuato attraverso l'inserimento di una sonda monouso sterile in trachea fino al livello bronchiale in modo da raccogliere il secreto bronchiale. Per effettuare il BAL è stata scelta la tecnica con accesso al polmone per via orale (Scollo *et al.*, 2011), utilizzando sonde monouso della lunghezza di circa 90 cm. Mediante l'utilizzo di una siringa monouso senza

ago è stato aspirato il fluido salivare e raccolto in provette sterili contenenti uno stabilizzatore commerciale (RNAlater, Qiagen) al fine di preservare il campione dalla degradazione dell'RNA. I campioni prelevati sono stati tutti contrassegnati con un codice univoco, trasportati in giornata a temperatura di refrigerazione e consegnati ai laboratori per l'analisi.

Estrazione RNA virale e ricerca virus

Sulle matrici siero, tampone nasale, tampone bronchiale, BALF e fluido salivare è stata effettuata la ricerca del virus della PRRS mediante RT-nested PCR descritto da Persia *et al.* (2001) e Monnier *et al.* (2005). L'RNA genomico virale è stato estratto dai sieri, dai tamponi nasali, dai tamponi bronchiali e dal BALF utilizzando l'E.Z.N.A.[®] Viral RNA Kit (Omega Bio-tek) e dai fluidi orali utilizzando il kit Rneasy[®] micro kit (Qiagen), specifico per la matrice saliva.

Valutazione della sensibilità delle matrici

Per calcolare la sensibilità relativa di ogni matrice è stato preso in considerazione il numero di capi positivi per ogni matrice alla RT-PCR per PRRSv sul totale dei capi esaminati per ogni prelievo. Per la valutazione della sensibilità è stata utilizzata l'opzione *proc freq* del software SAS[®] v9.2 utilizzando l'opzione *exact* per avere gli intervalli di confidenza al 95% calcolati con il metodo esatto.

RISULTATI

Complessivamente sono stati eseguiti 1.236 esami: 206 RT-PCR su siero, 206 RT-PCR su tampone nasale, 206 RT-PCR su tampone bronchiale, 206 RT-PCR su BALF, 206 RT-PCR su fluido salivare e 206 ELISA su siero. Nel corso dello studio, prima del T5, 2 animali sono morti e di conseguenza sono stati ottenuti dati completi (T1-T6) su 33 animali. In Tabella 1 sono rappresentati gli esiti della ricerca del PRRSv mediante RT-PCR sulle diverse matrici, ripartiti per numero di prelievo; in tutti i campioni i genomi virali rilevati corrispondevano al ceppo europeo.

Prelievo	capi con BALF+	capi con fluido salivare+	capi con siero+	capi con t.bronchiale+	capi con t.nasale +	capi totali +	Capi + / capi totali + (n)
T1	26%	11%	43%	71%	40%	94%	33/35
T2	11%	40%	34%	57%	31%	80%	28/35
T3	86%	40%	69%	71%	80%	97%	34/35
T4	51%	40%	23%	86%	34%	100%	35/35
T5	18%	21%	6%	61%	45%	88%	29/33
T6	12%	18%	3%	39%	12%	58%	19/33

Tabella 1. Prevalenza apparente e sensibilità relativa delle 5 matrici prelevate, in base al momento del prelievo (T1= 2 settimane dopo l'introduzione degli animali nel sito 3, T2= 4 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T3= 6 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T4= 8 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T5= 10 settimane dopo l'introduzione nel sito 3, T6= 12 settimane dopo l'introduzione nel sito 3).

Table 1. Apparent prevalence and relative sensitivity of the 5 matrices collected at different time of sampling (T1 = 2 weeks after the introduction in fattening pig unit, T2 = 4 weeks after the introduction in fattening pig unit, T3 = 6 weeks after the introduction in fattening pig unit, T4 = 8 weeks after the introduction in fattening pig unit, T5 = 10 weeks after the introduction in fattening pig unit, T6 = 12 weeks after the introduction in fattening pig unit).

Valutazione della sensibilità delle matrici

Il grafico 1 mostra, per ogni prelievo, la prevalenza apparente (percentuale di capi positivi per almeno una delle 5 matrici, indicata con la linea tratteggiata) e la sensibilità relativa di ogni matrice (percentuale di capi positivi per ogni matrice).

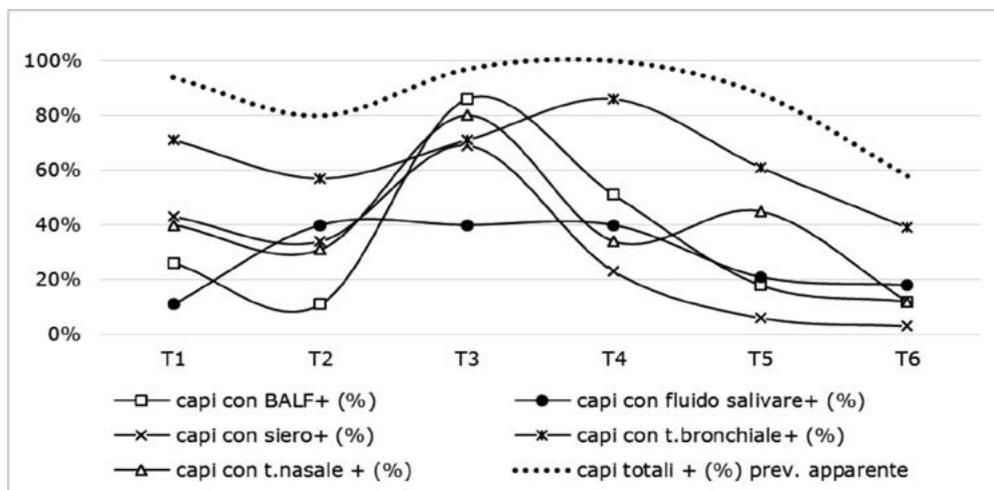


Grafico 1. Andamento della prevalenza apparente (linea tratteggiata) e sensibilità relativa delle 5 matrici considerate (BALF, fluido salivare, siero, tampone bronchiale, tampone nasale), in base al momento del prelievo

Graph 1. Apparent prevalence trend (dotted line) and relative sensitivity of the 5 matrices collected (BALF, saliva, serum, bronchial swab, nasal swab), related to the time of sampling

Come si evince dalla Tabella 1 e dal Grafico 1, le matrici che hanno permesso di rilevare il maggior numero di campioni positivi sono risultate il BALF al T3 (86.0%, IC95%= 80.3-91.7%) ed il tampone bronchiale al T4 (86.0%, IC95%=80.3-91.7%). In media, la matrice con la sensibilità relativa minore risulta il fluido salivare, mentre il tampone bronchiale ha fornito le migliori prestazioni (sensibilità relativa maggiore). Il più alto tasso di positività al virus è stato riscontrato dopo 8 settimane dall'introduzione degli animali nel sito 3 (T4), dove tutti gli animali hanno almeno una matrice biologica positiva alla RT-PCR.

L'evidenza di una attiva circolazione virale è stata dimostrata dalla presenza di viremia da PRRSv in tutti e 6 i prelievi. All'inizio dello studio (T1) la percentuale di soggetti viremici era pari al 43%, calava al 34% al T2, per raggiungere il picco del 69% al T3 e scendere infine al 3% al T6.

Valutazione della sensibilità attraverso l'interpretazione in parallelo

L'interpretazione in parallelo degli esiti ottenuti da alcune matrici consente di aumentare la sensibilità relativa.

La Tabella 3 (colonne in grigio) mostra che a T3 e T4 la sensibilità relativa aumenta fino al 94% se si valutano in parallelo gli esiti ottenuti dalle matrici tampone bronchiale e BALF. Al T3 anche l'interpretazione in parallelo tra siero e BALF raggiunge una sensibilità relativa del 94%.

Prelievo	capi con BALF+	capi con siero+	capi con t.bronchiale+	capi con BALF e/o t.bronchiale +	capi con siero e/o BALF +	capi con siero e/o t.bronchiale +	capi con BALF e/o t.nasale +	capi totali +
T1	26%	43%	71%	80%	54%	86%	57%	94%
T2	11%	34%	57%	66%	40%	69%	34%	80%
T3	86%	69%	71%	94%	94%	89%	89%	97%
T4	51%	23%	86%	94%	69%	86%	69%	100%
T5	18%	6%	61%	70%	21%	61%	55%	88%
T6	12%	3%	39%	42%	15%	39%	24%	58%

Tabella 3. Sensibilità relativa delle matrici singole e sensibilità relativa calcolata in parallelo con due matrici affiancate, in base al giorno di prelievo.

Table 3. Relative sensitivity of the individual matrices and relative sensitivity evaluated in parallel in two paired matrices, related to time of sampling.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti evidenziano una circolazione virale attiva nell'allevamento. Nei tre mesi successivi all'introduzione nel sito 3, tutti gli animali inseriti nello studio sono venuti a contatto con il virus della PRRS ed hanno avuto viremia. Pertanto tutti i soggetti testati sono stati utilizzati come *golden standard* ai fini del presente lavoro.

La viremia nel 43% dei soggetti al T1, il lieve calo delle positività al T2 ed il successivo picco al T3 suggeriscono l'ipotesi di ondate di infezioni successive all'interno del gruppo dei suini testati. Si suppone che siano stati introdotti nel sito 3 soggetti già viremici o nella fase calante dello stadio infettivo e che questi abbiano funto da serbatoio per l'infezione, stimolata anche dai fattori stressogeni derivanti dallo spostamento nel sito 3.

Il presente studio ha permesso di evidenziare che uno dei periodi più a rischio per PRRS è quello compreso tra le 12 e 20 settimane di età, interessando la prima fase del magronaggio-ingrasso. Ciò a riprova di quanto osservato in un recente studio olandese dove suini di 9-16 settimane di età si sono mostrati i soggetti ideali per rilevare il virus della PRRS in assenza di manifestazioni cliniche (Duijnhof *et al.*, 2011).

Il momento migliore per effettuare il prelievo e ottenere le migliori prestazioni con i test diagnostici corrisponde a 8 settimane dopo l'introduzione dei soggetti in allevamento, ad un'età stimata di circa 18 settimane. In tale periodo, in questo studio, tutti gli animali hanno presentato almeno una matrice biologica positiva alla RT-PCR per PRRSv.

Questo lavoro evidenzia che le differenze di sensibilità tra le matrici dipendono da molteplici fattori, tra i quali lo stadio di infezione, la sede di prelievo, la variabilità individuale e la presenza di fattori limitanti nella matrice (es. degradazione enzimatica dell'RNA nella saliva). Le matrici siero, tampone nasale e BALF presentano un picco di positività a T3, evidenziando la fase di infezione acuta. La sensibilità più alta del BALF a T3 potrebbe essere imputata alla presenza per circa il 93%, di macrofagi alveolari polmonari (PAMs, le cellule bersaglio della replicazione primaria del virus) e di linfociti (5%), neutrofili (0,5%), cellule dell'epitelio bronchiale (<1%), eosinofili e granulociti basofili (Ganter *et al.*, 1997). Nelle infezioni da PRRSv la percentuale di PAMs scende a partire da 14 dpi (*days post infection*) per poi risalire a 35 dpi. Viceversa, la percentuale di linfociti nel BALF aumenta da 21 dpi e poi cala a partire da 35 dpi (Shibata *et al.*, 1997). Gli antigeni intracellulari di PRRSv vengono rilevati sia nei PAMs che nel SF (surnatante del BALF) principalmente tra 7 e 49 dpi, mentre nel siero tra i 7 e 21 dpi. Il fatto che il PRRSv venga isolato da PAMs o SF per un periodo

più lungo rispetto al siero indicherebbe che il virus presente negli alveoli è un bersaglio meno soggetto all'azione della risposta immunitaria rispetto a quello presente nel siero contenente gli anticorpi circolanti. Inoltre, 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 tramite RT-PCR del BALF, proveniente perlopiù da un lobo polmonare caudale, è comparabile alle analisi del tessuto polmonare *in toto*, con il grande vantaggio di poter essere eseguito sull'animale *in vivo* (Scollo *et al.*, 2011). Tutto ciò potrebbe spiegare l'elevata capacità del BALF di evidenziare il virus nelle vie respiratorie durante lo stadio iniziale e anche fino ad alcune settimane dalla fine della fase viremica (Mengeling *et al.*, 1995). 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.

Per quanto riguarda il picco di positività dei tamponi nasali, precedenti studi confermano che la quantità di virus escreta nel muco nasale aumenta molto rapidamente e raggiunge il massimo a 2 dpi, poi diminuisce progressivamente fino a 48 dpi (Ruiz *et al.*, 2009).

La matrice più sensibile nel corso dei 6 prelievi risulta il tampone bronchiale, anche in presenza di basse quantità di virus. Tale matrice, rispetto ai tamponi nasali, proviene da parti più profonde del tratto respiratorio. Tuttavia, a differenza del BALF, risulta una matrice meno sensibile durante la fase viremica perché non preleva i macrofagi alveolari. Il motivo per cui riesca a rilevare per un periodo più prolungato il PRRSV rispetto alle altre matrici analizzate potrebbe essere attribuito alla sua composizione intrinseca. Il tampone raccoglie le secrezioni tracheo-bronchiali di un lungo tratto di vie respiratorie e può contenere tracce di cellule epiteliali, fluido salivare e secrezioni nasali. Queste sono matrici biologiche attraverso le quali il virus, che si replica anche nei linfonodi tracheo-bronchiali, può venire eliminato per via respiratoria. Sebbene ci siano risultati contrastanti, diverse pubblicazioni hanno infatti osservato cellule epiteliali bronchiali (Done *et al.*, 1995) e della mucosa nasale (Rossow *et al.*, 1996) positive all'antigene virale che, secondo Rutherford *et al.* (1993), potrebbero effettivamente rappresentare monociti/macrofagi migranti con fenotipo morfologico simile. Non è assolutamente da trascurare, inoltre, l'ipotesi che il tampone bronchiale possa rilevare il virus presente sull'epitelio delle cripte e nei follicoli delle tonsille (Halbur *et al.*, 1996).

Al momento, il fluido salivare si è mostrato essere la matrice meno prestante. Nonostante l'accorgimento di conservare i campioni con l'impiego di uno stabilizzatore, l'andamento temporale delle positività presenta un profilo anomalo caratterizzato da una fase di *plateau* quando le altre matrici hanno registrato un innalzamento delle positività. Tale osservazione potrebbe essere riconducibile alla difficoltà di ottimizzare le fasi di estrazione dell'RNA virale in questo tipo di campione (van Hout *et al.*, 2013).

Al fine di ottenere un aumento delle prestazioni diagnostiche di ciascuna matrice considerata sono stati valutati in parallelo gli esiti ottenuti da due matrici diverse. È emerso che nelle prime 4 settimane successive all'ingresso degli animali nel sito 3 la sensibilità più alta si ottiene se si testano in parallelo siero e tampone bronchiale. Ciò è dovuto al fatto che il virus è stato rilevato sia nel siero in relazione alla viremia, sia nel tampone bronchiale, dove è stato riscontrato nel corso di tutti i prelievi.

Dopo un mese dal rimescolamento si ottiene una sensibilità maggiore se si affiancano in parallelo le matrici BALF e tampone bronchiale. Come già suggerito in precedenza, il tampone bronchiale e il BALF si dimostrano matrici ottimali per la ricerca di PRRSV perché provengono entrambe da parti più profonde del tratto respiratorio rispetto al tampone nasale (Fablet *et al.*, 2011). Inoltre, poiché tali matrici rimangono positive per un periodo più lungo

rispetto alle altre, la finestra diagnostica risulta più ampia e ciò si traduce in un sensibile miglioramento delle prestazioni diagnostiche.

L'interpretazione in parallelo su siero e BALF raggiunge una sensibilità paragonabile alla combinazione tra BALF e tampone bronchiale solo al T3, dimostrando che sono due matrici molto adatte per rilevare il virus durante la fase acuta di un focolaio di PRRS. Tale dato è giustificato dalla viremia in atto, unita al picco di sensibilità del BALF che è la matrice con le concentrazioni più alte di macrofagi alveolari infetti.

CONCLUSIONI

Il presente studio dimostra che per individuare suini portatori e/o eliminatori di PRRSv non è sufficiente eseguire la ricerca del virus nel siero. È opportuno effettuare, pertanto, la ricerca del virus anche su altre matrici biologiche.

La matrice che mediamente ha fornito le migliori performances diagnostiche durante tutto il periodo considerato (primi 3 mesi della fase di magronaggio-ingrasso) risulta il tampone bronchiale, la cui tecnica di raccolta è relativamente semplice e abbastanza veloce.

Per aumentare le possibilità di rilevare capi infetti è opportuno testare in parallelo due matrici differenti. Indubbiamente, la combinazione tra BALF e tampone bronchiale presenta le migliori prestazioni, ma occorre tenere presente che la tecnica di raccolta del BALF è sicuramente indaginosa.

Una valida alternativa, nelle condizioni di campo dell'allevamento suinicolo, è rappresentata dal confronto in parallelo dei risultati ottenuti da sieri e tamponi bronchiali provenienti dagli stessi animali. La maggiore sensibilità del tampone bronchiale rispetto al siero, dovuta alla sua capacità di evidenziare il virus della PRRS nelle vie respiratorie anche dopo la fine della fase viremica, potrebbe fornire informazioni epidemiologiche e diagnostiche di grande tempestività, indipendentemente dalla fase di infezione, modificando l'approccio manageriale riguardo all'introduzione della rimonta nei siti di riproduzione oppure dei suini svezzati nel reparto magronaggio-ingrasso.

BIBLIOGRAFIA

- Done S.H., Paton D.J. (1995) "Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression". *Vet. Rec.*, 136(2):32-5.
- Duinhof T.F., van Schaik G., van Esch E.J.B., Wellenberg G.J. (2011) "Detection of PRRSv circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size". *Vet. Microb.* 150, 180–184.
- Fablet C., Marois C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Poezevara T., Kobish M., Madec F., Rose N. (2011) "Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant". *Journées de la Recherche Porcine*, 283-284
- Ganter M., Hensel A. (1997) "Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs". *Res. Vet. Sci.* 63, 215-217.
- Gidaris D., Kanakoudi, Tsakalidou F., Papakosta D., Tzimouli V., Taparkou A., Ventouri M., Tsankas I. (2010) "Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non inflammatory lung disease". *Hippokratia*, 14, 2: 109-114.
- Halbur P.G., Paul P.S., Frey M. L., Landgraf J., Eernisse K., Meng X.J., Andrews J.J., Lum M. A., Rathje J.A. (1996) "Comparison of the antigen distribution of 2 US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad-virus". *Vet. Pathol.*, 33, 159-170.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C. (1995) "Diagnosis of porcine reproductive

- and respiratory syndrome". *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 3-16.
- Monnier M., Kobal F., Ghia C.A., Buonincontro G., Gorla M. (2005) "Sindrome riproduttiva e respiratoria del suino: osservazioni preliminari per la ricerca del virus ceppo europeo nel siero mediante RT-Nested PCR". In "VII Congresso Nazionale SIDILV, Torino, 26-28 Ottobre 2005".
 - Moorkamp L., Nathues H., Spergser J., Teleger R., Grosse, Beilage E. (2008) "Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid". *Vet. J.*, 175, 273-275.
 - Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001) "Evaluation of three RTPCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples". In: "International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology".
 - 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.
 - Rossow K.D., Laube K.L., Goyal S.M., Collins J.E. (1996) "Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion". *Vet. Pathol.*, 33, 95-9.
 - Ruiz A., Neira V., Ramirez E., Garcia A., Lecocq C., Quezada M. (2009) "Excretion and transmission study of the Chilean porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate by means of RT-nPCR and ELISA in experimentally inoculated animals and sentinels in contact". *Arch. Med. Vet.*, 41, 221-228.
 - Rutherford M.S., Witsell A., Schook L.B. (1993) "Mechanism generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited". *Journal of Leukocyte Biology*, 53, 602-618.
 - Scollo A., Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Donna R., Gherpelli M. (2011) "Il lavaggio broncoalveolare (BAL) nel suino: due tecniche a confronto e nuove proposte per un concreto utilizzo di campo". in Atti SIPAS: "XXXIX meeting annuale SIPAS", Piacenza, 94-102
 - Shibata I., Mori M., Uruno K., Samegai Y., Okada, M. (1997) "In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection". *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 539-43.
 - Van Hout A.J.U., Franssen P.J.M., Wellen berg G.J., tempelmans Plat B.H.A., Buter G.J., van der Heijden H.M.J.F. (2013) "A comparison of oral fluids and blood samples from pigs for the detection of PRRS and PCV2 by PCR and antibody ELISA". in "16th Intern. Symposium of the WAVLD", 57.