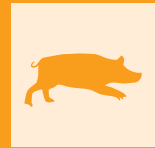


Matrici alternative al sangue per la sorveglianza delle malattie trasmissibili del suino



A. DE LUCIA, M. RAMBALDI, F. OSTANELLO

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

RIASSUNTO

La sorveglianza delle malattie trasmissibili è un aspetto cruciale per la gestione sanitaria degli allevamenti intensivi, in particolare quelli suinicoli, in considerazione della numerosità degli animali presenti, della loro elevata densità e del rapido turnover. Per essere efficaci e routinariamente utilizzabili, gli strumenti di sorveglianza devono possedere alcune caratteristiche: economicità, rappresentatività, facilità di prelievo dei campioni da analizzare, sensibilità e specificità dei risultati. La sorveglianza viene condotta prevalentemente avvalendosi di metodi diagnostici indiretti che utilizzano il siero di sangue come matrice per la ricerca di anticorpi specifici. Il prelievo ematico comporta dei costi legati alla manodopera oltre ad essere una tecnica relativamente complessa e fortemente stressante per l'animale. Per queste ragioni, da alcuni anni vengono impiegate matrici alternative al sangue (fluido orale, OF; succo di carne, MJ; fluidi di processazione, PF) come campioni individuali o di gruppo da utilizzare a scopo diagnostico. La raccolta di un campione di gruppo offre una serie di vantaggi: permette di esaminare contemporaneamente più individui, con un costo unitario inferiore e di accertare lo stato di malattia della popolazione. L'efficace utilizzo di matrici alternative al sangue richiede tuttavia la disponibilità di test diagnostici validati per queste matrici, la conoscenza della loro sensibilità e specificità assoluta e relativa al gold-standard (generalmente rappresentato dal siero di sangue) e la comprensione dei loro limiti applicativi. In questa review vengono prese in considerazione le principali matrici alternative al sangue, descrivendo le condizioni ottimali per il loro prelievo e utilizzo nell'ambito di piani di monitoraggio delle malattie trasmissibili negli allevamenti suinicoli intensivi.

PAROLE CHIAVE

Sorveglianza, suino, fluido orale, succo di carne, emosieri.

INTRODUZIONE

Gli aspetti sanitari sono un fattore chiave della produttività di qualsiasi sistema zootecnico ma rivestono una particolare importanza per l'industria suinicola a causa della natura altamente intensiva degli allevamenti.

Oltre alle forme cliniche di malattia, che si presentano spesso in modo epidemico, numerosi agenti eziologici sono responsabili di forme sub-cliniche, a carattere endemico che causano gravi conseguenze economiche dovute alla riduzione delle performances di accrescimento. Inoltre, l'assenza di sintomi clinicamente evidenti condiziona negativamente le possibilità di una diagnosi precoce del problema sanitario. In queste situazioni deve essere posta grande enfasi sul monitoraggio e la sorveglianza dei patogeni attraverso la raccolta regolare e sistematica di campioni biologici per l'esecuzione di test diagnostici diretti e/o indiretti.

I metodi utilizzati per il monitoraggio di routine delle malattie trasmissibili consistono, in genere, nella raccolta di campioni di sangue e nelle successive indagini sierologiche. Questi metodi forniscono informazioni affidabili ma presentano alcuni limiti. Ad esempio, il prelievo di sangue per il monitoraggio di routine è una prestazione di competenza del medico veterinario e che richiede la presenza di un secondo operatore per la cattura e il contenimento degli animali. Nei

suini, il metodo comunemente utilizzato per il prelievo ematico è la venopuntura giugulare, poiché consente di raccogliere un volume adeguato (in genere 3-5 ml) di sangue. Se sono sufficienti volumi più piccoli, il sangue può essere prelevato perforando una vena dell'orecchio. Entrambi i metodi di prelievo richiedono il contenimento dell'animale con conseguente stress¹, interferendo così con il benessere degli animali². Seppur limitato, esiste inoltre un rischio di morte nei suini sottoposti a prelievo di sangue, in particolare nei soggetti più giovani.

Matrici alternative al sangue quali il fluido orale e i *processing fluids*, che vengono raccolte in modo non invasivo anche da personale non veterinario e che sono in grado di fornire informazioni sanitarie accurate, possono consentire di ampliare le possibilità di monitoraggio delle malattie trasmissibili in allevamento. Inoltre, nel contesto aziendale, la diagnosi viene spesso approcciata sul piano del gruppo piuttosto che dal punto di vista individuale: i fluidi orali e i *processing fluids* possono quindi essere utilizzati efficacemente nell'ambito di questo tipo particolare di sorveglianza.

In associazione al monitoraggio condotto sugli animali in vita, che ha il vantaggio di fornire informazioni sanitarie utili all'implementazione immediata di eventuali misure di controllo, è possibile utilizzare anche metodi di sorveglianza basati sull'esame di campioni prelevati da animali macellati che forniscono, quindi, una valutazione a posteriori. In questo caso, una delle matrici biologiche utilizzabili è rappresentata da una frazione di muscolo da cui è possibile estrarre il succo di carne.

Autore per la corrispondenza:
Fabio Ostanello (fabio.ostanello@unibo.it).

In questo lavoro vengono prese in considerazione le principali matrici alternative al sangue, descrivendo le condizioni ottimali per il loro prelievo e utilizzo nell'ambito di piani di monitoraggio delle malattie trasmissibili negli allevamenti suinicoli intensivi.

MATRICI BIOLOGICHE ALTERNATIVE AL SANGUE

Fluido orale

Dal punto di vista diagnostico, il fluido orale (*oral fluid*, OF) è stato descritto come lo “specchio del corpo”³ in quanto è possibile evidenziare, al suo interno, molte delle sostanze bio-analitiche presenti nel sangue.

L'utilizzo dell'OF per la valutazione delle condizioni di salute e la diagnosi di malattia nell'uomo e negli animali ha una storia sorprendentemente lunga. I primi tentativi di diagnosticare alcune malattie metaboliche dell'uomo esaminando il fluido orale per una varietà di analiti, risalgono agli inizi del secolo scorso⁴. Nel 1909 venne riportata la positività ad un test di agglutinazione per *Brucella melitensis* in pazienti con diagnosi di Febbre malsese⁵, dimostrando quindi indirettamente la presenza di anticorpi nella saliva. Negli anni successivi, gli sviluppi delle tecniche diagnostiche che utilizzavano l'OF sono state oscurate dai miglioramenti dei test che utilizzavano sangue o siero. A partire dalla metà degli anni '80, la segnalazione della presenza nell'OF di anticorpi specifici per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV)⁶ dà nuova enfasi ai test che utilizzano l'OF. A causa di questa segnalazione e/o dei concomitanti progressi della tecnologia diagnostica, negli ultimi tre decenni nuovi test che utilizzano l'OF sono stati messi a punto, sviluppati, validati e implementati per una vasta gamma di malattie trasmissibili e non, farmaci, ormoni e marcatori di malattie.

In considerazione della varietà di metodi di raccolta dell'OF è importante descrivere accuratamente i campioni che ne risultano, usando una terminologia standardizzata. Seguendo le linee guida redatte da Atkinson et al.⁷, la saliva è definita come “il fluido ottenuto per espettorazione” mentre i fluidi orali come “il fluido ottenuto mediante l'inserimento di collettore assorbenti nella bocca”. I campioni ottenuti possono anche essere descritti come “stimolati” o “non stimolati” a seconda del metodo di raccolta o dell'utilizzo di stimolanti chimici per indurre il flusso salivare⁸. I campioni raccolti mediante l'utilizzo di materiali assorbenti sono di solito considerati “stimolati”, mentre quelli ottenuti mediante espettorazione o salivazione sono definiti “non stimolati”^{7,8}.

Il fluido orale è una miscela di secrezioni salivari e trasudati mucosali orali che, grazie a quest'ultimo componente, può fornire indicazioni sulle molecole presenti nel flusso sanguigno, anticorpi compresi, o sulla presenza in circolo di agenti eziologici^{9,10}. È attraverso la mucosa che gli agenti patogeni e gli anticorpi specifici presenti nel circolo possono essere trasferiti nella cavità orale e rilevati dall'esame dell'OF.

L'evidenza del passaggio di anticorpi sierici (IgG, IgM, IgA) dal sistema circolatorio alla cavità orale è stata dimostrata sperimentalmente¹¹. È stata inoltre descritta la produzione locale di anticorpi, da parte di plasmacellule di origine sierica, nelle ghiandole salivari e nel tessuto linfoide associato ai dotti (DALT)¹²⁻¹⁴. Queste cellule secernono IgA nella saliva in associazione con cellule epiteliali duttali e acinose che espri-

mono recettori specifici per le IgA. Nell'uomo, anche le ghiandole salivari minori (MSG) svolgono un ruolo sostanziale nella produzione di IgA, contribuendo per il 30-35% delle IgA totali prodotte in risposta a stimolazioni antigeniche locali. Anche IgM e IgG possono essere prodotte localmente ma a concentrazioni più basse rispetto alle IgA¹⁵.

Oltre ai diversi isotipi di immunoglobuline, nell'OF possono essere presenti anche molti agenti eziologici, sia locali sia sistemici, compresi alcuni degli agenti patogeni più significativi dal punto di vista economico per l'allevamento del suino (Tabella 1)¹⁶.

Nonostante sia possibile l'esame di fluidi orali prelevati dal singolo animale, l'utilizzo principale di questa matrice riguarda campioni raccolti da gruppi di animali, una percentuale variabile dei quali avrà contribuito a costituire il campione diagnostico che sarà utilizzato per valutare la presenza di anticorpi specifici e/o di agenti patogeni. Questa modalità è interessante in suinicoltura perché permette di esaminare contemporaneamente più individui con un costo unitario contenuto e di accertare lo stato sanitario dei gruppi di animali.

Fluido orale: prelievo e conservazione

La raccolta dei campioni di OF è una pratica di facile esecuzione che può essere eseguita dall'allevatore o da personale tecnico, non richiedendo una formazione specifica e che consente di ottenere rapidamente numerosi campioni a basso costo, senza stress per gli animali^{16,17}.

I suini hanno una naturale tendenza comportamentale a mordere e masticare oggetti a loro presentati anche se il livello di interazione tende a decrescere con l'aumentare dell'età¹⁸. Un campione di OF può essere raccolto lasciando a disposizione degli animali, legate ad un supporto in un punto relativamente pulito del box, una o più corde costituite da materiale assorbente. Tuttavia, per essere efficace, il prelievo dell'OF deve essere rappresentativo del gruppo. In condizioni di campo esistono numerosi fattori che potrebbero influenzare la probabilità che tutti i suini di un gruppo contribuiscano a formare il campione collettivo di OF: arricchimento ambientale¹⁹, dimensioni del gruppo²⁰, gerarchia all'interno del gruppo²¹, età¹⁸, modalità e tempi di presentazione della corda²². È interessante l'osservazione che i suini di 50 kg non perdono interesse anche a fronte di esposizioni ripetute alla corda²², permettendo così di ripetere nel tempo il prelievo.

La corda, del diametro di circa 1-1,5 cm, deve avere una lunghezza tale da non toccare il suolo e da consentire ai suini di interagire agevolmente (Figura 1A). L'OF viene successivamente estratto ponendo la corda dentro un sacchetto di plastica, strizzandola (Figura 1B) e raccogliendo il contenuto in una provetta dopo aver tagliato un angolo del sacchetto (Figura 1C). La quantità di OF raccolto da un box di 20 suini è di circa 10-12 mL se viene utilizzata una sola corda e può superare i 50 mL con 3 corde²², più che sufficiente per eseguire numerose determinazioni analitiche. Il numero di corde necessarie affinché un campione sia rappresentativo dipende dalla dimensione della popolazione e della numerosità degli animali presenti nel box. In genere, si ritiene che una corda consenta la raccolta di un campione rappresentativo di un gruppo composto da 30 animali. Se il numero di animali per box è maggiore, sarà necessario appendere più corde in aree diverse del box per attirare gruppi diversi di animali. Gene-

Tabella 1 - Esempi di possibile utilizzo diagnostico delle matrici alternative al sangue.

Matrice	Agente eziologico	Diagnosi diretta	Diagnosi indiretta	Riferimenti bibliografici
Fluidi orali	PRRSV		X	46
	PRRSV	X		47
	Virus influenzali	X		48, 49
	Virus influenzali		X	50
	Virus della peste suina classica		X	51
	Virus della peste suina classica	X		52
	Virus dell'afta	X		53
	Virus dell'afta		X	53
Succo di carne	Virus della malattia di Aujeszky	X		54
	Virus della malattia di Aujeszky		X	54
	PCV2	X		47
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>		X	55
	Salmonella		X	29-31, 56
	Virus dell'epatite E		X	57, 58
	Virus della malattia di Aujeszky		X	35
	Virus influenzali		X	59
	<i>Toxoplasma gondii</i>		X	28, 33, 56, 59, 60
	<i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Y. pseudotuberculosis</i>		X	56, 61
Fluidi di processazione	<i>Trichinella</i> spp.		X	56
	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>		X	59
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>		X	32
	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>		X	62
	PRRSV	X		36
PRRSV		X	36	
PCV2	X		36	



Figura 1 - Prelievo dei fluidi orali.

ralmente, in animali abituati agli arricchimenti ambientali, un tempo di 30 minuti è sufficiente a garantire che almeno il 75% degli animali presenti interagisca e mastichi le corde²². Se dall'osservazione del comportamento del gruppo dovesse risultare uno scarso livello di interazione con le corde, si raccomanda di aumentare il tempo di esposizione a 60 minuti². La tipologia della corda utilizzata può avere alcune ripercussioni sia sul prelievo sia sui risultati. In commercio sono disponibili corde in materiale naturale (cotone o canapa) oppure corde sintetiche in poliestere e poliammide (che assorbono l'acqua) o polipropilene e polietilene (idrorepellenti)¹⁷. La tipologia del materiale con cui è costruita la corda in-

fluenza in modo significativo il volume dell'OF raccolto, la concentrazione di isotipi anticorpali e la concentrazione di agente eziologico. Nonostante le corde in cotone siano quelle attualmente più diffuse e utilizzate per la raccolta di OF da impiegare in test diagnostici diretti o indiretti, è importante tenere in considerazione che la natura delle corde può influenzare i risultati delle analisi. Ad esempio, è stato dimostrato che l'utilizzo di corde di cotone o canapa aumenta la probabilità di evidenziare, mediante qRT-PCR, il genoma di PRRSV rispetto all'utilizzo di corde in materiale sintetico^{8,17,23}. Le corde in cotone sono inoltre le più indicate per la ricerca di IgG specifiche per PRRSV ma questo materiale in-

terferisce con la possibilità di mettere in evidenza IgA e IgM²³, per le quali si raccomanda la raccolta di OF mediante corde in fibra sintetica.

Sono relativamente scarse le informazioni disponibili circa la stabilità delle immunoglobuline e degli agenti eziologici presenti nell'OF. Per quanto riguarda il virus della PRRS, è stato dimostrato che temperature di conservazione >10°C per 24 ore riducono sensibilmente la quantità di RNA virale e di anticorpi specifici²⁴. Va inoltre considerato che la contaminazione batterica degli OF può essere consistente e che la conservazione a temperature relativamente basse, ma superiori a 0°C, può consentire la loro replicazione e le conseguenti variazioni di pH, interferendo così con le procedure diagnostiche.

Il fluido orale contiene comunemente particelle insolubili di derivazione ambientale (es. mangime, feci e materiale inorganico). Questi contaminanti non influenzano direttamente le prestazioni dei test diagnostici ma possono interferire con le procedure di esecuzione riducendo, ad esempio, la precisione della distribuzione dei reagenti mediante pipetta. Per rimuovere i particolati dall'OF possono essere utilizzate la filtrazione o la centrifugazione ad alta velocità per tempi prolungati; queste tecniche risultano tuttavia poco pratiche e dispendiose in termini di tempo. È stata anche valutata la possibilità di chiarificare gli OF utilizzando flocculanti chimici²⁵. Tuttavia, è importante considerare l'impatto che tali procedure possono avere sui risultati diagnostici²³. Nei campioni di OF, la centrifugazione (12000 x g per 8 ore) riduce significativamente la quantità di PRRSV²⁶. Anche la quantità totale di IgM, IgA e IgG viene ridotta dal trattamento (centrifugazione a 10000 x g per 2 ore seguita da filtrazione attraverso un filtro da 0,22 µm)²³. Altro fattore che può contribuire a ridurre la sensibilità delle tecniche biomolecolari utilizzate per la diagnosi diretta è la potenziale presenza nell'OF di sostanze, quali ad esempio la mucina, che possono catturare l'antigene o inibire la reazione di PCR²⁷.

Negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse per l'utilizzo dell'OF e numerosi lavori sperimentali hanno dimostrato il suo possibile utilizzo come matrice per la diagnosi diretta ed indiretta di importanti patologie del suino (Tabella 1); tuttavia, non tutte queste applicazioni diagnostiche sono routinariamente disponibili.

Succo di carne

Il succo di carne (*meat juice* o *muscle exudate*, MJ) è definito come "fluido di gocciolamento rilasciato dalla carne dopo congelamento e scongelamento"²⁸.

Questa matrice viene impiegata da alcuni decenni per il mo-

nitoraggio al macello di alcune infezioni (Tabella 1), con particolare riferimento a quelle potenzialmente zoonotiche.

Oltre al monitoraggio al macello, il MJ è utilizzato, con un approccio retrospettivo, nei piani di sorveglianza volti a monitorare l'andamento della malattia in azienda attraverso campionamenti periodici. In Danimarca, ad esempio, la prevalenza aziendale di *Salmonella* è stimata in base ai risultati ottenuti esaminando campioni di MJ prelevati al momento della macellazione. Sulla base dei risultati del test ELISA, gli allevamenti vengono classificati in tre categorie epidemiologiche: bassa, moderata, alta siero-prevalenza per *Salmonella*²⁹.

Il limite principale di questa matrice, prelevabile esclusivamente dagli animali macellati, è la dimostrazione del fatto che i test sierologici realizzati utilizzando il succo di carne potrebbero non essere in grado di rilevare animali con bassi titoli anticorpali³⁰. Il MJ è infatti considerato una diluizione fisiologica del siero poiché costituito da siero, linfa e fluido intra- ed extracellulare³¹. Di conseguenza la quantità di anticorpi specifici è inferiore rispetto a quella presente nel siero e, per compensare ciò, il succo di carne è di solito esaminato a diluizioni più basse, spesso circa 10 volte inferiori rispetto al siero³¹. Inoltre, la quantità di anticorpi specifici presenti nel MJ dipende anche dal muscolo scelto per il campionamento^{31,32}, probabilmente a causa del grado di vascolarizzazione³³. È probabile che anche l'efficienza del dissanguamento, lo stress e lo stato di idratazione degli animali al momento della macellazione influenzino la quantità di anticorpi presenti nel MJ^{33,34}.

Succo di carne: prelievo e conservazione

Il prelievo di campioni di carne è facilmente realizzabile, anche da parte di personale tecnico, in qualsiasi posizione della linea di macellazione³³.

Per ottenere il MJ è necessario prelevare una porzione muscolare (Figura 2A) di circa 3 cm per lato (circa 20 grammi) che verrà posta all'interno di un sacchetto di plastica. Generalmente la porzione di carne viene prelevata dal muscolo diaframmatico o sternomastoideo. Per ottimizzare la resa in succo di carne è opportuno rimuovere la componente grassa. Il campione viene quindi congelato a -20°C per almeno 12 ore e successivamente posto a scongelare a 4°C per 12-24 ore in appositi contenitori (Figura 2B) che, sostanzialmente, sono costituiti da un imbuto collocato sopra una provetta entro la quale fluisce il succo di carne³³. Con questa metodica, la resa è di circa il 7%, consentendo di ottenere oltre 1 ml di succo di carne³⁵. In alternativa, il MJ può essere raccolto ponendo il frammento di muscolo all'interno di un sacchetto di plastica bloccato con un elastico (Figura 2C).

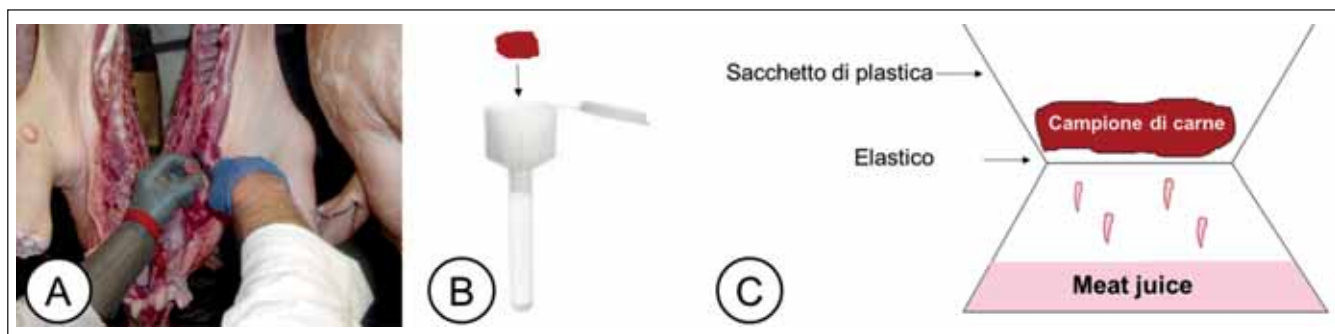


Figura 2 - Prelievo del meat juice.

Tuttavia, fattori quali il contenuto residuo di sangue presente nel muscolo, il livello di stress degli animali nelle fasi pre-macellazione, il contenuto di glicogeno nel muscolo, il valore di pH post-macellazione, la presenza di fasce fibrotiche nel tessuto muscolare che ostruiscono il rilascio di MJ e influenzano la velocità di congelamento e scongelamento, possono causare una diminuzione della resa³¹.

Fluidi di processazione

I fluidi di processazione (*processing fluids*, PF) sono definiti come “un campione aggregato di fluidi sieromematici recuperato al momento del taglio della coda o della castrazione dei suinetti”³⁶.

Le prime esperienze di utilizzo di questa matrice sono relativamente recenti ma i risultati sono interessanti in termini di concordanza degli esiti diagnostici ottenuti esaminando questa matrice rispetto alle matrici convenzionali³⁷. Ovviamente, il principale limite di queste matrici è il loro possibile utilizzo solo per i suinetti sottoscrofa e, per quanto riguarda gli emosieri testicolari, il fatto che il campione sia rappresentativo solo della popolazione maschile. I PF possono essere efficacemente utilizzati per la sorveglianza sierologica e/o eziologica delle infezioni che coinvolgono i suinetti in giovane età quali quelle sostenute da PRRSV e PCV2. In particolare, l'utilizzo degli emosieri testicolari potrebbe essere vantaggioso soprattutto per quanto riguarda la sorveglianza della circolazione di PRRSV: esistono infatti dimostrazioni della replicazione del virus a livello testicolare (cellule epiteliali e macrofagi)³⁸. Questa osservazione potrebbe giustificare la maggiore probabilità di evidenziare la presenza di PRRSV negli emosieri testicolari rispetto ai corrispondenti pool di campioni ematici³⁶ o dagli emosieri ricavati dalle code³⁹.

Fluidi di processazione: prelievo e conservazione

Il prelievo può essere realizzato direttamente dal personale addetto alla castrazione. Per la raccolta viene utilizzato un contenitore ad imboccatura larga (secchio/secchiello) all'interno del quale viene posto un sacchetto di plastica. Sull'imboccatura del contenitore viene quindi posta una garza (Figura 3A). La garza va posizionata in modo che si crei uno spazio concavo entro il quale verrà posto il materiale prelevato (Figura 3B). Sacchetto e garza verranno fissati al bordo del contenitore mediante un elastico. Per migliorare la resa, è sufficiente refrigerare il contenitore con il materiale prelevato per circa un'ora. Successivamente, la garza contenente i testicoli e le code viene rimossa e l'emosiero che si è raccolto nel sacchetto di plastica (Figura 3C) viene trasferito in una provetta tagliando un angolo del sacchetto³⁶. Per semplificare la raccolta, è possibile porre il materiale prelevato direttamente dentro un sacchetto di plastica. In media, considerando che la resa è di circa 180 µl di emosiero/suinetto³⁶ è quindi possibile raccogliere campioni aggregati a livello di nidiata o di sala parto. Al momento, non sono disponibili informazioni relative all'influenza delle condizioni di trasporto e di conservazione sulle performances diagnostiche.

vato (Figura 3B). Sacchetto e garza verranno fissati al bordo del contenitore mediante un elastico. Per migliorare la resa, è sufficiente refrigerare il contenitore con il materiale prelevato per circa un'ora. Successivamente, la garza contenente i testicoli e le code viene rimossa e l'emosiero che si è raccolto nel sacchetto di plastica (Figura 3C) viene trasferito in una provetta tagliando un angolo del sacchetto³⁶. Per semplificare la raccolta, è possibile porre il materiale prelevato direttamente dentro un sacchetto di plastica. In media, considerando che la resa è di circa 180 µl di emosiero/suinetto³⁶ è quindi possibile raccogliere campioni aggregati a livello di nidiata o di sala parto. Al momento, non sono disponibili informazioni relative all'influenza delle condizioni di trasporto e di conservazione sulle performances diagnostiche.

CONSIDERAZIONI SULL'UTILIZZO DEI POOL

Per ragioni economiche, di tempo, di personale, di strutture diagnostiche, ecc., la sorveglianza delle malattie trasmissibili è realizzata prevalentemente su base campionaria, esaminando un numero ridotto di animali. La sorveglianza su base campionaria consente di raggiungere 2 obiettivi: a) stimare se, all'interno di un gruppo di animali, l'infezione è presente al di sopra di un certo valore di prevalenza attesa (a prescindere dal numero assoluto di soggetti infetti); b) stimare la prevalenza di animali che presentano la caratteristica indagata (es. percentuale di animali sieropositivi per PRRSV). Tuttavia, le attività di sorveglianza perseguono prevalentemente il primo obiettivo che è quello che consente la maggiore economicità. In entrambi i casi, oltre alla scelta degli animali da esaminare, il fattore cruciale è rappresentato dalla numerosità campionaria rapportata alle dimensioni della popolazione⁴⁰. In questa situazione, l'esame di pool è estremamente vantaggioso perché permette di ampliare la numerosità dei soggetti esaminati senza incidere sui costi. Sebbene sia possibile esaminare individualmente le matrici alternative al sangue, l'interesse maggiore risiede nel loro utilizzo come campione di gruppo. Il campione di gruppo può essere costituito a partire da campioni prelevati individualmente e successivamente aggregati per costituire un pool oppure può essere la risultanza di campioni prelevati direttamente dal



Figura 3 - Prelievo dei fluidi di processazione.

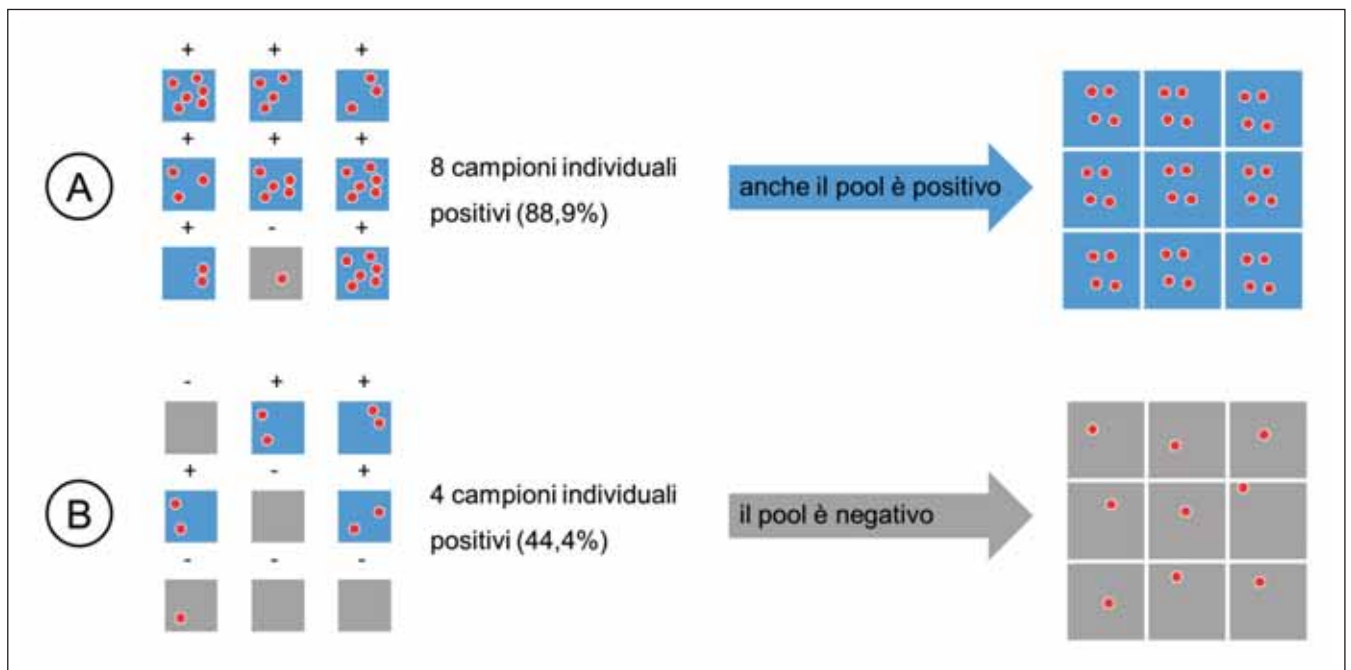


Figura 4 - Rappresentazione schematica della riduzione della sensibilità diagnostica derivante dall'utilizzo dei pool.

Nota. In ciascuno dei due scenari (A e B) sono stati esaminati prima 9 campioni individuali e successivamente un pool formato dai 9 campioni individuali. Il test diagnostico utilizzato fornisce un esito positivo quando nel campione sono presenti almeno 2 unità di analita (in rosso). Nello scenario A, 8/9 campioni individuali hanno fornito esito positivo (prevalenza 88,9%); anche il pool è risultato positivo. Nello scenario B, 4/9 campioni individuali hanno fornito esito positivo (prevalenza 44,4%); il pool è risultato negativo. Utilizzando un test diagnostico con una sensibilità analitica maggiore (es. 1 unità), in entrambi i casi i pool sarebbero risultati positivi.

gruppo, come nel caso degli OF o dei fluidi di processazione. Queste due modalità contribuiscono in modo diverso al protocollo diagnostico, ai costi ad esso correlati e alla interpretazione dei risultati. Nel primo caso, l'esame del pool può rappresentare una fase preliminare di screening che viene utilizzata per valutare se nel campione collettivo sono presenti componenti individuali positivi. In caso di positività del pool, è possibile eseguire una diagnosi su ciascuna delle matrici individuali che hanno contribuito alla sua costituzione. Nel secondo caso, la diagnosi riguarderà esclusivamente il gruppo.

La stima del numero dei pool da prelevare e del numero di soggetti che contribuiscono a formarli deve prendere in considerazione numerosi fattori quali: il tipo di agente eziologico e la fase dell'infezione in cui si trovano gli animali, la prevalenza reale dell'infezione e quindi la possibilità che l'analita venga "diluito" al di sotto della soglia analitica del metodo (quantità minima di analita necessaria per ottenere una reazione positiva, Figura 4), la sensibilità del test diagnostico, la quantità di analita (es. anticorpi, DNA, RNA) presente per unità di volume, ecc.⁴¹

Stabilire la numerosità del pool (cioè il numero di soggetti che contribuiscono a formarli) richiede conoscenze specifiche dell'epidemiologia di ciascuna infezione e delle caratteristiche del singolo allevamento. Ammettendo che il test diagnostico utilizzato abbia una sensibilità del 100% e ignorando il fattore diluizione, la probabilità di ottenere un esito positivo dall'esame di un pool aumenta con l'aumentare della prevalenza e del numero di soggetti che contribuiscono al campione collettivo^{42,43} (Figura 5).

A parità di sensibilità diagnostica e di numerosità dei pool, il loro numero diminuisce all'aumentare della prevalenza dell'infezione⁴⁴ (Figura 6). Purtroppo, nonostante siano largamente disponibili le informazioni relative alla sensibilità dei

metodi diagnostici applicati a campioni individuali, sono ancora relativamente scarse quelle relative all'applicazione degli stessi metodi a campioni collettivi⁴⁵. È tuttavia possibile, utilizzando risorse liberamente disponibili (es. <http://epi-tools.ausvet.com.au>) stabilire il numero di pool da esaminare e le loro dimensioni in funzione di valori ipotizzati di sensibilità diagnostica (Figura 6).

DISCUSSIONE

Le matrici alternative al sangue offrono numerosi vantaggi rispetto ai campioni tradizionali e possono essere analizzate, per quanto riguarda la diagnosi diretta, utilizzando le tecniche già disponibili, con poche modifiche che riguardano prevalentemente le fasi pre-analitiche o l'interpretazione dei risultati. Questo non è possibile per le tecniche di diagnosi indiretta: non è infatti possibile sostituire il siero di sangue con le matrici alternative se non sono disponibili informazioni relative alle conseguenze, in termini diagnostici, che questo comporta. Al fine di ampliare e migliorare l'utilizzo delle matrici alternative al sangue come strumento di diagnosi indiretta per la sorveglianza delle malattie trasmissibili, sono necessari ulteriori sforzi che consentano di validare i risultati ottenuti rispetto al gold standard rappresentato dal siero di sangue. Inoltre, molte di queste matrici sono dei pool e ciò può avere importanti ripercussioni in termini di sensibilità analitica. Numerose sono le tecniche diagnostiche disponibili ma il loro efficace utilizzo per l'esame di matrici diverse rispetto a quelle per le quali sono state messe a punto necessita in genere di modifiche (es. diluizione del campione, modificazione dei tempi di reazione, variazione dei valori di cut-off, ecc.) che possono influenzare i risultati. Queste modificazioni devono essere validate per stabilire le performances, in termini

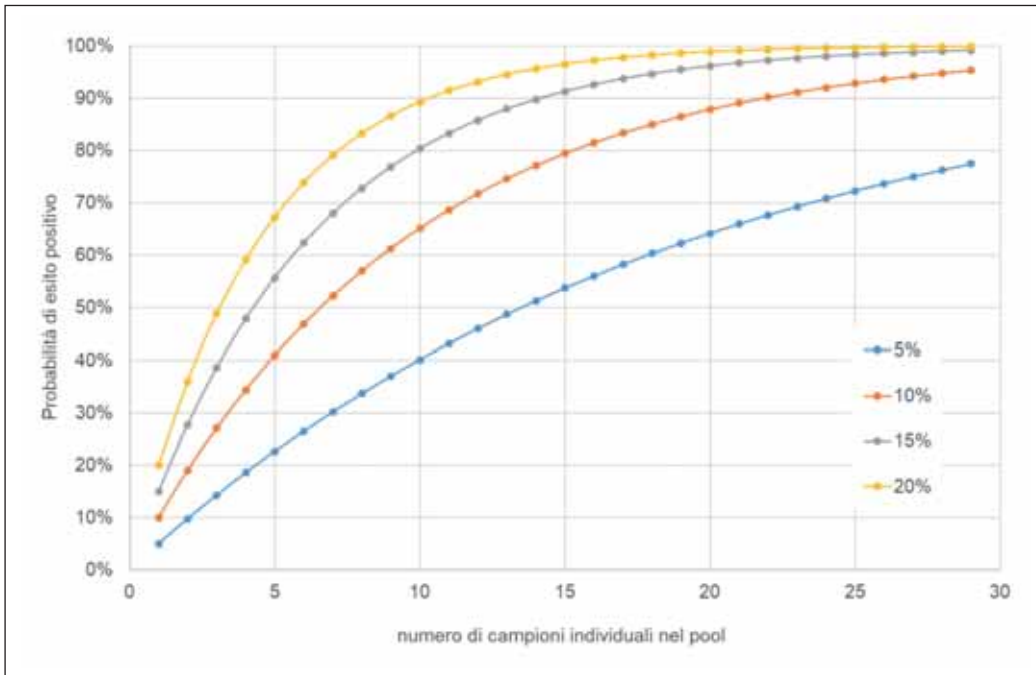


Figura 5
 Probabilità teorica (assumendo che il test diagnostico abbia una sensibilità del 100%) di esito positivo dall'esame di un pool al variare della prevalenza (dal 5 al 20%) e del numero di campioni individuali che costituiscono il campione collettivo.

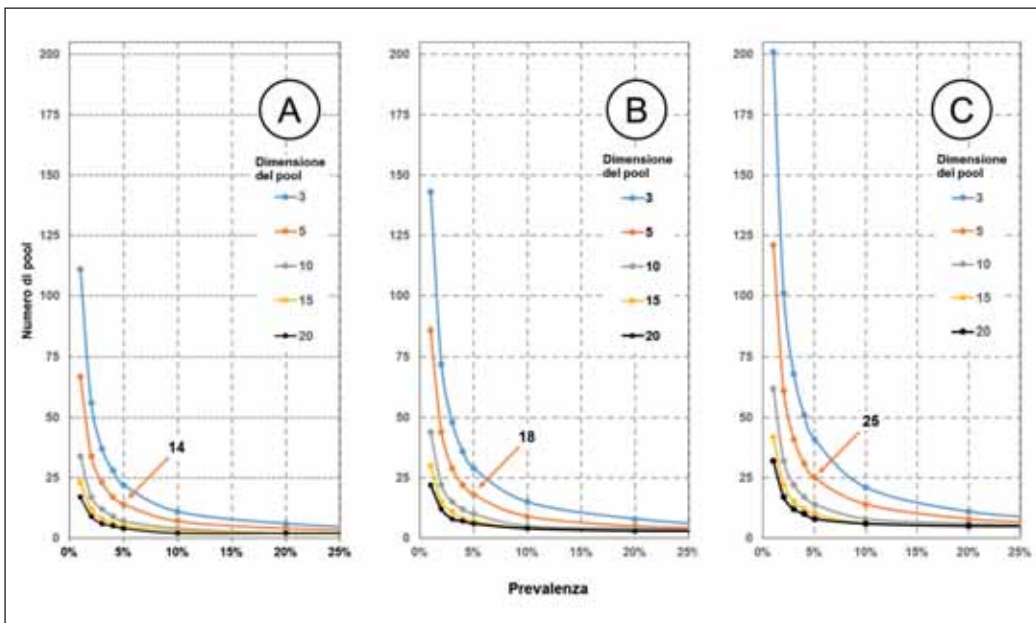


Figura 6
 Variazione del numero di pool da esaminare per escludere la presenza della malattia in funzione della prevalenza attesa e delle dimensioni del pool. La sensibilità dell'esame del pool è del 90% in **A**; del 70% in **B** e del 50% in **C**. **Nota.** Se la sensibilità dell'esame del pool è del 70% (**B**) e la prevalenza è $\geq 5\%$, sono necessari 18 pool costituiti da 5 campioni individuali per garantire il 95% di probabilità che almeno 1 dei pool risulti positivo; se la sensibilità è inferiore (**C**) sono necessari 25 pool; se la sensibilità è superiore (**A**) sono necessari 14 pool.

di sensibilità e specificità di questi test diagnostici realizzati su matrici alternative al sangue e quali sono i valori di concordanza dei risultati. Questo aspetto è stato già valutato solo per alcune infezioni (es. *Salmonella*) e solo per alcune matrici (es. meat juice). Altro punto critico è rappresentato dalla necessità di valutare le performances diagnostiche di un esame condotto su un campione collettivo, ad esempio qual è la proporzione minima di animali infetti fra quelli che hanno contribuito alla formazione del pool che consente di ottenere un risultato positivo.

L'utilizzo delle matrici alternative al sangue, oltre a rappresentare un buono strumento nell'ambito dei piani di monitoraggio, sorveglianza e individuazione delle malattie trasmissibili all'interno degli allevamenti intensivi di suini⁸, può essere considerato una pratica di facile esecuzione, economica ed "animal friendly". Frequentemente, a causa di motivi legati ai costi per la diagnosi, lo stato di malattia è mantenuto,

all'interno delle aziende, dalla mancanza di informazioni tempestive sulla circolazione dei patogeni. Alla luce di ciò le matrici alternative al sangue, in particolare il fluido orale e i fluidi di processazione offrono la possibilità di semplificare e rendere più economiche le procedure di raccolta periodica e sistematica delle informazioni sulla situazione epidemiologica e sanitaria dell'allevamento. L'integrazione longitudinale dei dati sanitari con quelli derivanti dalla valutazione degli altri parametri aziendali (es. trattamenti terapeutici e/o profilattici, incidenza, mortalità, parametri produttivi) permette di migliorare la rapidità di intervento, di valutare "in tempo reale" l'efficacia delle strategie messe in atto e, soprattutto, fornisce accurate stime sull'impatto dei patogeni sulla salute e produttività degli animali presenti in allevamento¹⁶. Questo approccio proattivo al monitoraggio delle malattie in campo traduce i costi diagnostici in migliori performance dell'allevamento.

■ Oral fluids, meat juice, and processing fluids: non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs

SUMMARY

The surveillance of infectious diseases represents a crucial aspect for the management of the herd health. This is of particular importance for the pig industry due to the high density and highly intensive nature of pig farms. In order to be effective and routinely usable, surveillance tools must be cost-effective and representative, collection of samples must be easy and the results must be reliable. Current pig disease surveillance relies primarily on monitoring humoral immunity via serum. However, blood sampling is costly and stressful for the animals. Recently, alternative diagnostic media such as oral fluid, meat juice, and processing fluids (oral fluid, OF; meat juice, MJ; processing fluids, PF) have been rapidly gaining interest. Relying on pig natural chewing behaviour and exploratory motivation, the collection of OF is easily carried out by hanging cotton ropes in pig pens. After being chewed by the animals, ropes are manually squeezed and the resultant oral fluid samples are collected in sterile tubes. In trained pigs, a rope hung for 30 minutes in a pen 25/28 pigs is representative for 75% of the animals housed in that pen. OF is used as a diagnostic matrix for the detection of pathogens and pathogen-specific antibodies. MJ defined as “drip fluid released from meat after freezing and thawing” is a sample type usually collected at the slaughter line. Meat samples for testing are tissue samples of roughly 3 cm, collected from diaphragmatic and neck muscles. After collection samples are stored at -20°C for at least 12 h and thawed in special containers to release the meat juice, which trickled into a collecting tube. MJ samples are mainly used in serological assays to monitor infectious diseases. PF are serosanguinous fluids recovered from piglet at the time of piglet castration and tail docking. Tissues are wrapped in a disposable gauze which allows fluids to pass through it and be collected in a clean bucket. To improve the yield of fluids, samples can be refrigerated. PF can be used for the detection of antigens and/or antibodies against a variety of pathogens. One of the major advantages of the PF and the OF specimens as well is due to the fact that can be collected at both the individual or group level (pooled samples). By using pooled samples, a large number of animals can be tested for a reduced cost, compared with the cumulative cost of individual testing. Optimization of commercial immunoassays is required to show the efficient application of alternative blood matrices. This review summarizes the main alternative biological matrices other than blood, focusing on the optimal conditions of their collection and their application for diseases monitoring in pig herds.

KEY WORDS

Surveillance, swine, oral fluid, meat juice, processing fluids.

Bibliografia

- Roozen A.W., Tsuma V.T., Magnusson U. (1995) Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts. *Am J Vet Res*, 56: 1225-1227.
- White D., Rotolo M., Olsen C., Wang C., Prickett J., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher C., Hoogland M. (2014) Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 22: 138-141.
- Mandel I.D. (1993) Salivary diagnosis: promises, promises. *Ann N Y Acad Sci*, 694: 1-10.
- Michaels P. (1901) Saliva as an aid in the detection of diathetic diseases. *Dental Digest*, 7: 105-110.
- Pollaci G. S. C. (1909) [The agglutinating properties of several body fluids during Malta Fever] <original> Das agglutinationsvermögen einiger körperflüssigkeiten beim Mediterranfieber. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 52: 268-275.
- Archibald D.W., Zon L., Groopman J.E., McLane M.F., Essex M. (1986) Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood*, 67: 831-834.
- Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., Mandel I., Navazesh M., Tabak L. (1993) Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Ann N Y Acad Sci*, 694: xi-xii.
- Olsen C.W. (2012) Sampling considerations pertinent to the detection of analytes in swine oral fluids. *Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University*.
- de Almeida Pdel V., Gregio A.M., Machado M.A., de Lima A.A., Azevedo L.R. (2008) Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 9: 72-80.
- Gutierrez A.M., Ceron J.J., Fuentes-Rubio M., Tecles F., Beeley J.A. (2014) A proteomic approach to porcine saliva. *Curr Protein Pept Sci*, 15: 56-63.
- Challacombe S.J., Russell M.W., Hawkes J.E., Bergmeier L.A., Lehner T. (1978) Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunology*, 35: 923-931.
- Mestecky J. (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol*, 7: 265-276.
- Morrier J.J. Barsotti O. (1990) [Secretary IgA and the oral cavity: general review]. *Actual Odontostomatol (Paris)*, 44: 349-364.
- Nair P.N. Schroeder H.E. (1986) Duct-associated lymphoid tissue (DALY) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunology*, 57: 171-180.
- Challacombe S.J., Percival R.S., Marsh P.D. (1995) Age-related changes in immunoglobulin isotypes in whole and parotid saliva and serum in healthy individuals. *Oral Microbiol Immunol*, 10: 202-207.
- Prickett J.R. Zimmerman J.J. (2010) The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev*, 11: 207-216.
- Decorte I., Van Breedam W., Van der Stede Y., Nauwynck H.J., De Regge N., Cay A.B. (2014) Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet Res*, 10: 134.
- Docking C.M., de Weerd H.A.V., Day J.E.L., Edwards S.A. (2008) The influence of age on the use of potential enrichment objects and synchronisation of behaviour of pigs. *Appl Anim Behav Sci*, 110: 244-257.
- Scott K., Taylor L., Gill B.P., Edwards S.A. (2007) Influence of different types of environmental enrichment on the behaviour of finishing pigs in two different housing systems. 2. Ration of pigs to enrichment. *Appl Anim Behav Sci*, 105: 51-58.
- Turner S.P., Sinclair A.G., Edwards S.A. (2000). The interaction of liveweight and the degree of competition on drinking behaviour in growing pigs at different group sizes. *Appl Anim Behav Sci*, 67: 321-334.
- Craig J.V. (1986) Measuring social behavior: social dominance. *J Anim Sci*, 62: 1120-1129.
- Seddon Y.M., Guy J.H., Edwards S.A. (2012) Optimising oral fluid collection from groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *Vet J*, 193: 180-184.
- Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., Panyasing Y., Zimmerman J. (2013) Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J*, 198: 158-63.
- Prickett J.R. (2009) Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. *Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University*.
- Hena-Diaz Y.A., Gimenez-Lirola L., Poonsuk K., Cheng T.Y., Wang C., Ji J., Baum D.H., Main R.G., Zimmerman J.J. (2018) Effect of chemical clarification of oral fluids on the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus IgG. *J Vet Diagn Invest*, 30: 671-677.
- Rotolo M., White D., Chittick W., Strait E.L., Prickett J., Main R., Zimmerman J. (2012) A new wrinkle in PRRSV oral fluid PCRs. *Proc. of the 43rd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. Denver, Co.

27. Park N.J., Li Y., Yu T., Brinkman B.M., Wong D.T. (2006) Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem*, 52: 988-994.
28. Ranucci D., Veronesi F., Branciarri R., Miraglia D., Moretta I., Fioretti D.P. (2012) Evaluation of an immunofluorescence antibody assay for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from finishing pigs. *Foodborne Pathog Dis*, 9: 75-78.
29. Wegener H.C., Hald T., Lo Fo Wong D., Madsen M., Korsgaard H., Bager F., Gerner-Smidt P., Molbak K. (2003) Salmonella control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis*, 9: 774-780.
30. Vico J.P., Mainar-Jaime R.C. (2011) The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of Salmonella infection in pigs and its possible implications on Salmonella control programs. *J Vet Diagn Invest*, 23: 528-531.
31. Nielsen B., Ekeröth L., Bager F., Lind P. (1998) Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *J Vet Diagn Invest*, 10: 158-163.
32. Wallgren P., Persson M. (2000) Relationship between the amounts of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 detected in blood serum and in fluids collected from muscles of pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 47: 727-737.
33. Wallander C., Frossling J., Vagsholm I., Burrells A., Lunden A. (2015) "Meat juice" is not a homogeneous serological matrix. *Foodborne Pathog Dis*, 12: 280-288.
34. Davies R.H., Heath P.J., Coxon S.M., Sayers A.R. (2003) Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for Salmonella. *J Appl Microbiol*, 95: 1016-1025.
35. Le Potier M.F., Fournier A., Houdayer C., Hutet E., Auvigne V., Hery D., Sanaa M., Toma B. (1998) Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec*, 143: 385-387.
36. López W.A., Angulo J., Zimmerman J., Linhares D.C.L. (2018) PRRS monitoring in breeding herds using processing fluids. *Journal of Swine Health and Production*, 126: 146-150.
37. Smith M., Waddell J., Hartsook G., Lower A., Laura G., Luis O. (2018) Litter porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) status at processing and relationship to PRRS status at weaning using different pools of sampling tissues. *Proc. of the 49th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 84-85.
38. Sur J.H., Doster A.R., Christian J.S., Galeota J.A., Wills R.W., Zimmerman J.J., Osorio F.A. (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol*, 71: 9170-9179.
39. Hood M., Hough S., Angulo J., Nemeček G., Lopez W., Linhares D. (2018) A comparison of the use of tails versus testicles in the production of processing fluids for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proc. of the 49th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 99-100.
40. Thrusfield M. (2018) Surveys. In: *Veterinary Epidemiology 4th ed.*, 270-294, Wiley-Blackwell.
41. Dohoo I., Martin W., Stryhn H. (2014) Screenig and diagnostic tests. In: *Veterinary epidemiology research 2nd ed.*, 92-127, VER Inc., Canada.
42. Dorfman R. (1943) The detection of defective members of large populations. *The Annals of Mathematical Statistics*, 14: 436-440.
43. Williams B.G. (2010) Optimal pooling strategies for laboratory testing. *arXiv:1007.4903*: 1-3.
44. Sergeant E.S.G. (2018) Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Available from: <http://epitools.ausvet.com.au>.
45. Maherchandani S., Munoz-Zanzi C.A., Patnayak D.P., Malik Y.S., Goyal S.M. (2004) The effect of pooling sera on the detection of avian pneumovirus antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay test. *J Vet Diagn Invest*, 16: 497-502.
46. Ramirez A., Wang C., Prickett J.R., Pogranichny R., Yoon K.J., Main R., Johnson J.K., Rademacher C., Hoogland M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J. (2012) Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med*, 104: 292-300.
47. Prickett J., Kim W., Simer R., Yoon K.J., Zimmerman J. (2008) Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod*, 16: 86-91.
48. Decorte I., Steensels M., Lambrecht B., Cay A.B., De Regge N. (2015) Detection and isolation of Swine Influenza A Virus in spiked oral fluid and samples from individually housed, experimentally infected pigs: potential role of porcine oral fluid in active Influenza A Virus surveillance in swine. *PLoS One*, 10: e0139586.
49. Detmer S.E., Patnayak D.P., Jiang Y., Gramer M.R., Goyal S.M. (2011) Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest*, 23: 241-247.
50. Gerber P.F., Dawson L., Strugnell B., Burgess R., Brown H., Opriessnig T. (2017) Using oral fluids samples for indirect influenza A virus surveillance in farmed UK pigs. *Vet Med Sci*, 3: 3-12.
51. Corthier G., Aynaud J.M. (1977) Comparison of the immune response in serum and bucco-pharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain). *Ann Rech Vet*, 8: 159-165.
52. Panyasing Y., Kedkovid R., Thanawongnuwech R., Kittawornrat A., Ji J., Gimenez-Lirola L., Zimmerman J. (2018) Effective surveillance for early classical swine fever virus detection will utilize both virus and antibody detection capabilities. *Vet Microbiol*, 216: 72-78.
53. Eble P.L., Bouma A., de Bruin M.G., van Hemert-Kluitenberg F., van Oirschot J.T., Dekker A. (2004) Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 22: 1372-1378.
54. Panyasing Y., Kedkovid R., Kittawornrat A., Ji J., Zimmerman J., Thanawongnuwech R. (2018) Detection of Aujeszky's disease virus DNA and antibody in swine oral fluid specimens. *Transbound Emerg Dis*, doi: 10.1111/tbed.12961.
55. Loftager M.K., Eriksen L., Nielsen R. (1993) Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci*, 54: 57-62.
56. Meemken D., Tangemann A.H., Meermeier D., Gundlach S., Mischok D., Greiner M., Klein G., Blaha T. (2014) Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". *Prev Vet Med*, 113: 589-598.
57. Wacheck S., Werres C., Mohn U., Dorn S., Soutschek E., Fredriksson-Ahomaa M., Martlbauer E. (2012) Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis*, 9: 655-660.
58. Casas M., Pina S., Peralta B., Mateu E., Casal J., Martin M. (2011) Comparison of muscle fluid and serum for detection of antibodies against hepatitis E virus in slaughter pigs. *Vet J*, 190: 179-180.
59. Meemken D., Blaha T. (2011) "Meat juice multi-serology" - A tool for the continuous improvement of herd health and food safety in the framework of the riskbased meat inspection of slaughter pigs. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 62: 192-199.
60. Felin E., Nareaho A., Fredriksson-Ahomaa M. (2017) Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. *Vet Parasitol*, 238: 30-34.
61. Bonardi S., Bruini I., D'Incau M., Van Damme I., Carniel E., Bremont S., Cavallini P., Tagliabue S., Brindani F. (2016) Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. *Int J Food Microbiol*, 235: 125-132.
62. Song Y., Frey B., Hampson D.J. (2012) The use of ELISAs for monitoring exposure of pig herds to *Brachyspira hyodysenteriae*. *BMC Vet Res*, 8: 6.