

SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO. DETECCIÓN DE ANTÍGENO TISULAR. ASPECTOS CLÍNICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS Y SEROLÓGICOS EN LOS ESTADOS ARAGUA Y CARABOBO, VENEZUELA

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Tissue Antigens Detection. Clinical, Anatomopathological and Serological aspects in Aragua and Carabobo States, Venezuela

Carmen T. Díaz¹, Elías Sogbe¹, Elías Ascanio¹, Andrés Boulanger² y Carolina Rodríguez¹

¹Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563. ²Ladivet, Apartado 4562.
Maracay, estado Aragua, Venezuela

RESUMEN

Se realizó un estudio en 12 granjas porcinas ubicadas en dos estados centrales de Venezuela: Aragua y Carabobo. Se evaluaron clínicamente 706 cerdos entre Octubre de 1996 y Diciembre de 1997, detectándose síntomas de afección respiratoria y falta reproductiva. Se tomaron 706 muestras de sangre de 204 cerdos, 472 de lechones destetados y 30 de crecimiento y engorde. De las 12 granjas evaluadas, en dos había brotes sugestivos de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), en siete granjas había historia de enfermedad respiratoria persistente, en 2 había desórdenes reproductivos y en 3 no existía historia de PRRS. La prueba serológica para PRRS se realizó con un Kit comercial de ELISA. Cincuenta animales fueron estudiados por anatomía patológica realizándose la necropsia y el estudio macroscópico, microscópico, así como la detección de antígeno tisular. Las muestras fueron colectadas de cerdos con signos de fiebre, debilidad, secreción nasal y disnea, tejidos de los pulmones y tonsilas fueron procesados utilizando el procedimiento de inmunoperoxidasa. Los resultados revelaron seropositividad en la prueba de ELISA para PRRS de un 88% en el estado Aragua (8/9) y del 100% (3/3) en Carabobo. El estudio anatomopatológico permitió demostrar variedad de lesiones pulmonares y presencia de antígeno tisular en tonsilas y macrófagos alveolares en todos los casos de animales afectados. En esta investigación se señala la presencia de antígeno de PRRS por primera vez en granjas porcinas de estos Estados en Venezuela. Se pudo asumir que todos los casos de PRRS eran debidos a infección natural, en

razón de no existir vacunas para esa enfermedad para el periodo bajo estudio.

Palabras clave: Porcinos, serología, antígeno tisular, PRRS.

ABSTRACT

An study was carried out in 12 pig farms located in two central states of Venezuela: Aragua and Carabobo. Seven hundred and six pigs were clinically evaluated between October 1996 and December 1997. The clinical signs of animals were respiratory and reproductive disorders. A total of 706 blood samples from 204 pigs, 472 from weanling piglets and 30 growing-finishing pigs. Two of 12 farms, had outbreaks that suggested PRRS, in 7 farms there was history of persistent respiratory disease, in 2 farms there was reproductive disorders, and in 3 farms there was no history of PRRS. A serologic test for PRRS was performed using an ELISA commercial Kit. Fifty pigs were submitted to the necropsy laboratory, for gross and microscopic evaluation. Tissue samples were taken for histopathologic observations as well as for tissue antigen detection. These samples were collected from pigs with clinical signs such as: fever, weakness, nasal discharge and dyspnea. The tissue from lung and tonsils were processed using the immunoperoxidase procedure. Results were: 88% PRRS seropositive in Aragua State (8/9), and 100% in Carabobo State (3/3) by the use of Elisa Test. The anatomopathological study allowed to find a variety of lung lesions, as well as the presence of tissue PRRS antigens in tonsils and alveolar macrophages in all affected animals. This aspect is the first report of PRRSV in Venezuela by antigen detection using the immunoperoxidase method. Since no autogenous nor commercial vaccines were used in Ve-

nezuela at the time period when this study was performed, it can be assumed that all cases of PRRS were due natural infection.

Key words: Porcine, serology, tissue antigen, PRRS.

INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino viral (PRRSV) es un proceso infeccioso reconocido en todo el mundo, y ha tenido efectos devastadores, diezmando poblaciones suinas en USA y en Europa [5, 6, 19].

La enfermedad es producida por un virus del género Arterivirus, referido como ATTC-2332 cadena de virus en Norteamérica y como virus de Lelystad en Europa [4].

Está claro que PRRS es un problema de salud multifactorial y con clínica muy variable. En algunos casos infecta cerdos sin originar enfermedad, las formas clínicas pueden afectar a cerdos de cualquier edad; los efectos primarios involucran al aparato respiratorio y el sistema reproductivo [3, 8, 13, 14], no obstante la ubicación del virus en otros tejidos incluye localizaciones en tonsilas, cerebro, ojo, corazón, testículos y placenta, conocidos como infección de sitios inmunoprivilegiados, esto se cree sea uno de los mecanismos utilizados por los virus para escapar del sistema inmune y establecer infecciones persistentes durante la fase temprana de PRRS [21].

Otros autores señalan el aumento de susceptibilidad a contraer otras enfermedades y, el efecto sobre el tracto genital de la hembra [16], la susceptibilidad de hembras inseminadas con semen de verracos conteniendo virus del PRRS [17], y la infección transplacentaria [18]. Todo lo anteriormente citado guarda cerrada relación con mecanismos de inmunorrespuesta [1, 23], depleción inmunológica y macrofágica [15]. Se han reportado cepas que difieren en virulencia [10, 23, 24].

Los brotes de la enfermedad con evidencias clínicas en Venezuela se inician en 1996, caracterizados por disnea, alta morbilidad y mortalidad en lechones en crecimiento y engorde, las pruebas para el diagnóstico serológico de PRRS fueron permitidos en el país desde 1996 y descritas en 1997 [2, 7, 19].

El diagnóstico de PRRS se basa en los signos clínicos [20, 22, 24], aislamiento viral, determinación serológica de anticuerpos usando el método de inmunoperoxidasa (ELISA), anticuerpos fluorescentes indirectos, pruebas de seroneutralización, prueba de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y prueba de latex. Una de las ventajas del test de ELISA es el incremento de la sensibilidad, cuando se compara con otras pruebas y permite la determinación de anticuerpos en fases tempranas de la enfermedad, es sencillo y relativamente económico. La Histopatología, y microscopía electrónica son también importantes métodos diagnósticos. La detección de antígeno tisular de PRRS por el método de inmunoperoxidasa,

permite poner de manifiesto la presencia específica viral en los tejidos [7, 9, 11].

En el presente trabajo se presenta el estado de seropositividad (ELISA en PRRSV) en sueros colectados en varias granjas porcinas del centro del país entre Octubre de 1996 y Diciembre de 1997, así como aspectos clínicos e histopatológicos de la enfermedad y la detección de antígeno de PRRS en tonsilas y pulmones por el método de Inmunoperoxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre Octubre de 1996 y Diciembre de 1997, un total de 706 sueros de 12 granjas porcinas de los estados Aragua y Carabobo fueron evaluados. Las muestras de sangre fueron colectadas de 204 cerdas y verracos, 472 lechones y 30 cerdos en crecimiento-engorde. Todos los animales eran de raza Yorkshire-mestizos.

De las 12 granjas, en 2 habían evidencias clínicas de brotes sugestivos de PRRSV, (falla reproductiva, abortos, mortalidad elevada en lechones recién nacidos y en destete), en 7 historia de enfermedad respiratoria persistente en cerdos en crecimiento, en 2 granjas había desórdenes reproductivos y en 3 granjas no había historia sugestiva de PRRSV.

Las muestras de suero para la determinación de anticuerpos de infección por PRRSV se realizaron usando un kit comercial de ELISA, el cual detecta antígeno tisular. (HerdCheck[®]. PRRS, IDEX Laboratories). Se siguieron las instrucciones para su uso según descripción de la casa productora [11]. La prueba se realiza en placas de micropocillos que contienen el antígeno absorbido, en ellos se colocan las muestras de suero, que de contener anticuerpos podrán ser detectados por un anticuerpo marcado con una enzima, la cual reaccionará con el substrato. Esta reacción puede ser medida por un espectrofotómetro (Lector de Elisa) y esta lectura se transpola a lo que se denomina índice S/P. Índices S/P por debajo de 0,4 se consideran negativos y aquellos que sean iguales o mayores a 0,4 se consideran positivos. La granja era considerada positiva cuando al menos una de las muestras resultó positiva. Para cada granja positiva, la seropositividad fue calculada como el radio intermedio entre el número de sueros positivos y el número total de muestras de la granja.

Se colectaron muestras de tejidos de 50 lechones fallecidos que mostraban signos de fiebre, debilidad, secreción mucosa nasal y disnea; los especímenes fueron fijados en formalina bufferada al 10%, para su posterior deshidratación e inclusión en parafina, obteniéndose secciones de 5 a 6 μ , y luego coloreadas con Hematoxilina y Eosina, (H-E), según técnicas convencionales [12].

Muestras de tonsilas y de diferentes sitios de pulmones se tomaron para ser procesadas en la detección de antígeno de PRRSV utilizando el procedimiento de inmunoperoxidasa recomendado por la casa manufacturadora (Vectastain[®] Elite

ABC Kits, PRRS, Vector Laboratories). El fundamento de la prueba de inmunoperoxidasa en la detección de antígeno en tejidos consiste en utilizar anticuerpos conjugados con enzimas (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que actúan sobre un sustrato cromógeno en presencia de peróxido de hidrógeno, produciendo un complejo visible insoluble de color marrón localizado en el sitio de la reacción, así los antígenos a investigar aparecen como depósitos coloreados en el tejido, en los sitios de unión antígeno-conjugado, estos cromógenos son permanentes y visibles con microscopio óptico. Además los cortes histológicos son coloreados con hematoxilina de Meyers, de esta forma las características morfológicas del tejido se observan simultáneamente con la distribución del inmunomarcado [7, 9, 11].

Los casos fueron observados y evaluados en un microscopio óptico y los más representativos fueron registrados y fotografiados.

RESULTADOS

Estudio clínico

La sintomatología de esta enfermedad varía mucho de una explotación a otra, los principales síntomas son a grandes rasgos los siguientes: anorexia transitoria 4-7 días, hipertermia, problemas respiratorios, dificultades de crecimiento y aumento de mortalidad, afecta a cerdos de todas las edades, TABLA I.

Los síntomas referentes a trastornos reproductivos incluyen: abortos o partos prematuros, fetos momificados, tasas de fecundación disminuidas.

Estudio serológico

La seropositividad en granjas fue del orden de 88% (8/9) en las muestras provenientes del estado Aragua y en el 100% (3/3) en el estado Carabobo, TABLA II.

Estudio anatomopatológico

El examen macroscópico de los pulmones de los cerdos necropsiados no mostró lesiones en el 30% de los casos, mientras el resto evidenciaba cambios morfológicos significativos resumidos en la, TABLA I.

Las evaluaciones histopatológicas mostraron que el 100% de los pulmones de lechones afectados clínicamente presentaban Neumonitis intersticial, con infiltrado linfoplasmocitario en los septos y paredes alveolares que variaban de leve a moderado y severo, TABLA I; FIGS. 1, 2, 3.

El resto de los órganos estudiados (corazón, timo, bazo, hígado, sistema nervioso, riñones) no mostraron alteraciones significativas.

El hallazgo más significativo fue la Neumonitis intersticial señalada, con importante incremento de células mononucleares (linfocitos, plasmocitos, histiocitos) en los septos alveolares, hiperplasia de Neumocitos tipo I y degeneración de células de revestimiento de la pared alveolar, estos cambios aparecían de tipo focal, multifocal, difuso, y variando de leve a moderado y severo. El 50% de los casos evaluados presentó evidencias de infecciones secundarias bacterianas.

Detección de antígeno tisular

En todos los casos clínicos la detección de antígeno de PRRSV tisular fue positivo en pulmones y tonsilas demostrando en macrófagos positividad al antígeno de PRRSV mediante el método de inmunoperoxidasa descrito. Se pudo apreciar en los cortes histológicos la presencia del inmunomarcado, el cual presentaba un color pardo marrón característico.

La detección de antígeno específico en macrófagos se apreció específicamente en las paredes alveolares y en algunos ubicados en la luz, FIGS. 4 y 5, así como también en las

TABLA I
LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS EN 50 CERDOS NATURALMENTE INFECTADOS POR PRRSV

Lechones Nº	Edad	Macroscópico	Microscópico
1,2,3,4,5,6,7	neonatal 1 semana	S.L.A	neumonitis intersticial leve
8,9	neonatal 2 semanas	leve consolidación	neumonitis intersticial leve
10,11,12,13,14	neonatal 3-5 semanas	consolidación multifocal	neumonitis intersticial moderada
15,16,17,18,19,20	5-7 semanas	S.L.A.	N.I. leve + hiperplasia bronquiolar
21,22,23,24,25	9 semanas	lesiones de neumonía enzoótica	N.I. leve + neumonía exudativa
26,27,28,29,30	10 semanas	consolidación lóbulo craneal	N.I. moderada + neumonía hemorrágica
31,32,33,34,35	10 semanas	consolidación lóbulo craneal	N.I. moderada + neumonía hemorrágica
36,37,38,39,40	12 semanas	S.L.A.	neumonitis intersticial moderada
41,42,43,44,45	12 semanas	consolidación panlobar	N.I. severa + n. exudativa
46,47,48,49,50	12 semanas	consolidación craneolobar	N.I. severa + alveolitis necrotizante + N. exudativa

S.L.A.= Sin Lesiones Aparentes. N.I.= Neumonitis Intersticial. N.= Neumonía.

TABLA II
PRRS. DETECCIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS EN LOS ESTADOS ARAGUA Y CARABOBO

Estados	Granja	Signos Clínicos	Cerdas	Muestras (P/T) Lechones	Cerdos	Total
Aragua	P	-	0/20	0/20		0/40
	B	A	13/22	55/84		68/106
	A	A	11/11	41/72		52/83
	D	A		17/42		17/42
	C	R/A	6/6	60/90		66/96
	E	-	11/23	12/55	10/10	33/88
	F	A	17/19			17/19
	G	R/A	12/15	8/15	10/10	30/40
	H	-	6/20	1/20		7/40
Carabobo	I	A		23/40		23/40
	J	A	17/18	16/22		33/40
	K	A	10/50	0/12	9/10	19/72
Total	12		103/204	233/472	29/30	365/706
Prevalencia %			50,5	70,5	96,7	51,7

ID= Identificación de granjas. Signos clínicos: A= Neumonía, R= Reproductivos. Muestras: P = muestras positivas, T = total muestras.



FIGURA 1. PRRS. MICROGRAFÍA DE PULMÓN: MUESTRA LEVE ENGROSAMIENTO DE LAS PAREDES ALVEOLARES (FLECHA). H.E: 250X.

tónsilas, en éstas, los sitios de ubicación fueron subepiteliales y perifoliculares, FIGS. 6 y 7.

DISCUSIÓN

Aunque en Venezuela se sospechaba la existencia de la enfermedad no fue sino hasta 1997 cuando se reportó la entidad en el país, evidenciando su importancia en las poblaciones suinas [19].

En el presente estudio se evidencian los aspectos clínicos respiratorios coincidentes con lo señalado por otros autores a nivel de otras latitudes [3, 5, 6, 12, 22].

Los resultados de la investigación señalan que la enfermedad de PRRS está presente en los estados Aragua y Carabobo, donde la producción suina es intensiva, pudiendo diseminarse a otras regiones sino se controla adecuadamente.

La positividad serológica de granjas con síntomas asociados a PRRS en el estado Aragua fue de 88%, (8/9), y de

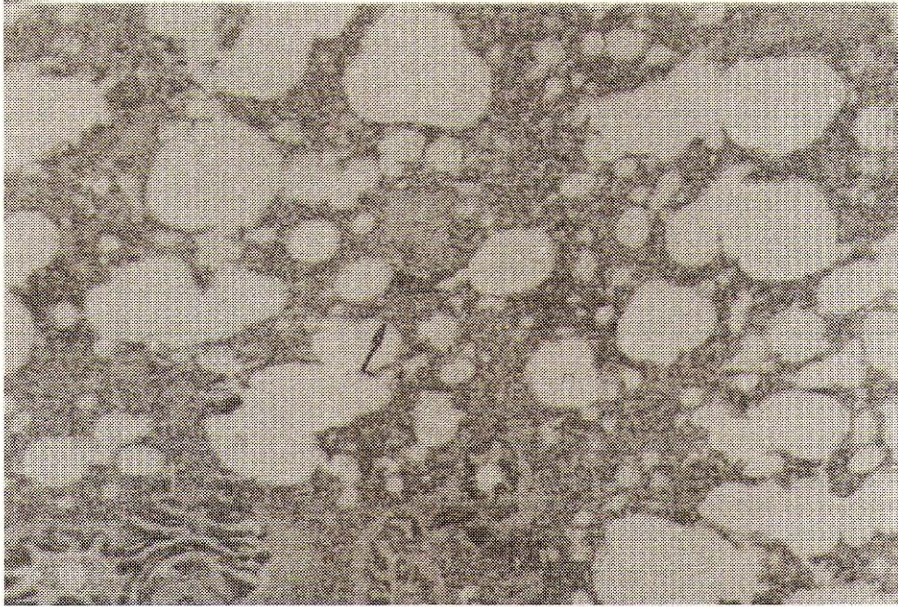


FIGURA 2. PRRS. MICROGRAFÍA DE PULMÓN: SE APRECIA MODERADO INFILTRADO MONONUCLEAR OCUPANDO LOS SEPTOS ALVEOLARES. (FLECHA) H.E: 250X

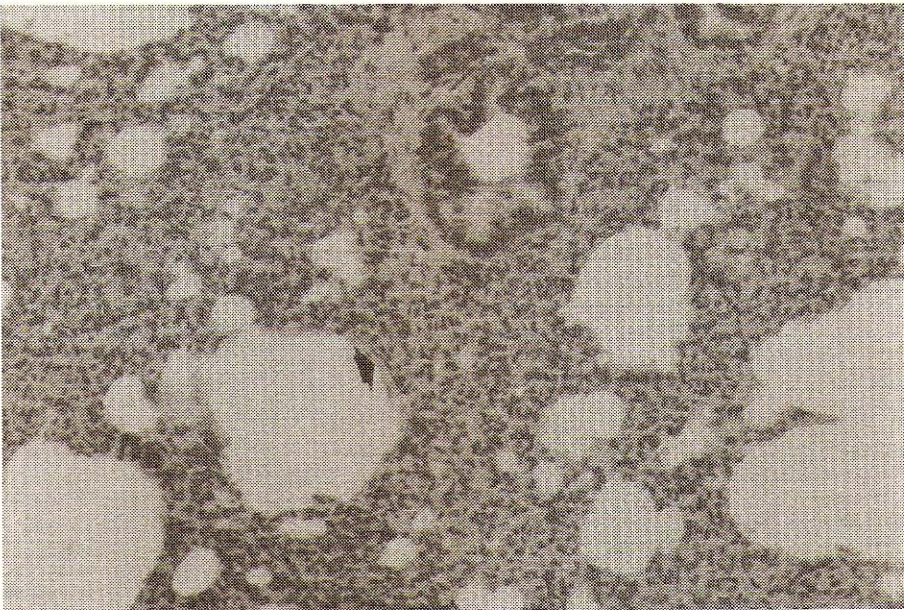


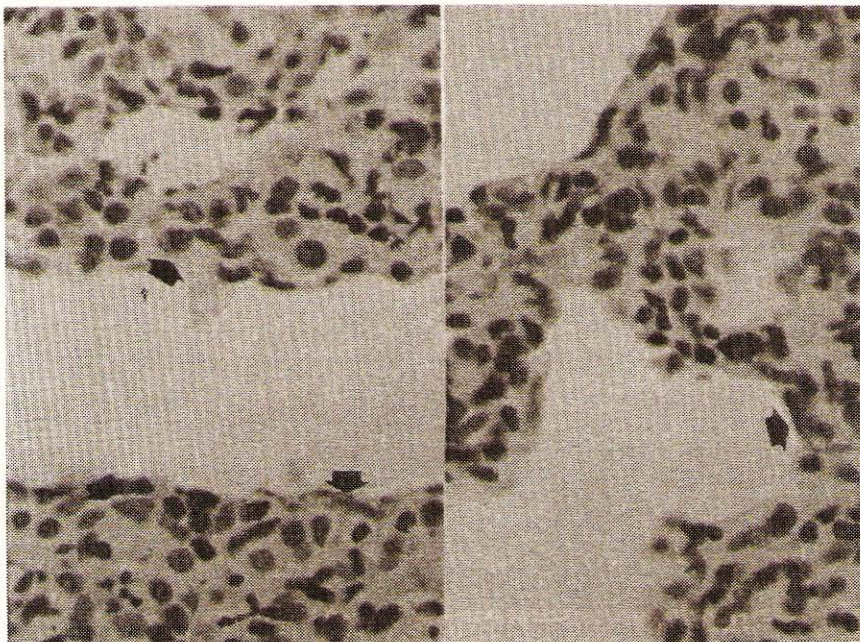
FIGURA 3. PRRS. NEUMONITIS INTERSTICIAL SEVERA, CON DENSO INFILTRADO INFLAMATORIO LINFOPLASMOCITARIO SEPTAL. (FLECHA) H:E: 250X.

100% en el estado Carabobo (3/3), ello permite presumir que la actual prevalencia a PRRS en el territorio nacional pueda ser mucho más elevada que lo señalado en este trabajo y, es homologable a las investigaciones realizadas en los Estados Unidos de Norteamérica y en Europa [2, 6].

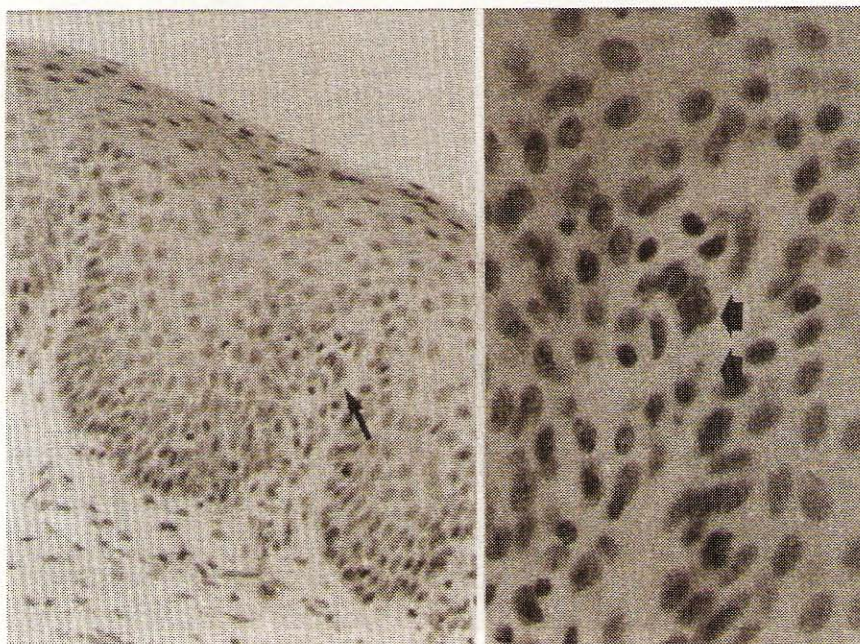
El estudio anatomopatológico indica que cerdos de todas las edades pueden estar afectados. Si bien en algunos casos no se observan lesiones macroscópicas, en otros predomina la Neumonitis intersticial y la injuria viral a la barrera macrófaga alveolar, con alteración de Neumocitos II, tal como lo reportan otros autores [5, 7]. La infección secundaria

bacteriana observada en el 50% de los casos, sugiere la inmunodepresión ocasionada por el virus, permitiendo la instalación de gérmenes oportunistas, aunque no fue objetivo de este trabajo el estudio bacteriológico, los hallazgos microscópicos permiten sugerir la acción patógena de otros gérmenes, como bacterias.

La detección de antígeno tisular para PRRS por el método de inmunoperoxidasa en pulmones y en tonsilas permitió observar a los macrófagos encargados de recibir la ofensa inicial del virus, presentando un color pardo-marrón característico de la especificidad del método. El mismo se utilizó por pri-



FIGURAS 4 Y 5. PRRS. PULMÓN. MÉTODO DE INMUNOPEROXIDASA: PERMITE APRECIAR A LA IZQUIERDA: MACROFAGOS SEPTALES POSITIVOS A LA REACCIÓN DE COLOR PARDO MARRÓN (FLECHA). A LA DERECHA: MACRÓFAGO POSITIVO EN EL REVESTIMIENTO ALVEOLAR (FLECHA). H.E 400 X.



FIGURAS 6 Y 7. PRRS. TONSILA. MÉTODO DE INMUNOPEROXIDASA. A LA IZQUIERDA: NÓTESE LA PRESENCIA DE MACRÓFAGOS PARDO-MARRONES SUBEPITELIALES POSITIVOS (FLECHA). H.E. 250 X. A LA DERECHA EN MAGNIFICACIÓN (FLECHAS).H.E. 400X.

mera vez en Venezuela, demostrando ser una técnica diagnóstica importante para PRRS, en dichos tejidos. Esto permite despertar interés a futuro de la detección del virus en otros órganos de la economía (cerebro, corazón, nódulo linfático, etc.), señalados como inmunoprivilegiados en fases tempranas de la enfermedad, y de los cuales se tienen muy escasos reportes mundiales [21, 23].

CONCLUSIONES

Los hallazgos clínicos, serológicos, anatomopatológicos y la detección de antígeno tisular para PRRS con el método de inmunoperoxidasa, son de particular importancia en el diagnóstico de PRRS en Venezuela y pueden ser tomados como pauta para futuras investigaciones.

La evaluación serológica revela la presencia de la enfermedad en los estados Aragua y Carabobo y permite presumir su posible distribución en el país, por lo cual debe hacerse un estudio nacional de prevalencia.

Como para el período en el cuál se realizó el presente estudio no estaban disponibles vacunas autógenas ni comerciales, se puede concluir que todos los casos de PRRS aquí reseñados eran debidos a infección natural o producto de contaminación de reproductores o subproductos cárnicos provenientes del extranjero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBINA, E.;MADEC, F.; CARIOLET, R.; TORRISON, J. Immuno response and PRRSV persitence in pigs and farms infected. **Vet. Rec.** 136: 567-573.1994.
- [2] BOULANGER, A.; MOSCARDI, A. Prevalence and serologic profile of antibodies in PRRSV from several farms in Venezuela. In: **15 IPVS Congress**. Birmingham. England. July 5-7: 312. 1998.
- [3] CARR, J. El Síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Etiología, signos clínicos, diagnóstico, control y tratamiento. **Albeitar**. 12: 8-9. 1998.
- [4] CAVANGH D. Nidovirales: a new order comprising Coronoviridae and Arteriviridae. **Arch Virol** 142: 629-633. 1997.
- [5] DONE, S.H.;PATTON, D.J.;BROWN, I.;SCOTT, A.; COOLEY, W. Pathology of porcine and respiratory syndrome (PRRS) in the U.K. In: **Proceedings of 12th IPVS Congress**.Bologna.Italia. July 7-10: 111. 1992.
- [6] DONE, S.H.; PATTON, D.J. Porcine reproductive and respiratory syndrome, clinical disease, pathology and immunosupression. **Vet.Rec.** 136:23-25.1995.
- [7] DIAZ, C.T.; SOGBE, E.; BOULANGER, A.; ASCANIO, E.; RODRIGUEZ, C.; INFANTE, R.; YUFA, B. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Tissue antigens detection in Venezuela. Clinical, Pathological and serological aspects. In: **15 IPVS Congress**. Birmingham. England July 5-7. 113. 1998.
- [8] FENG, W.H.; McCAW, T.; BROWN, J.; XU, M.; TOMKINS, S.; LASTER, C.; BENFIELD, D. Lesions and clinical effects observed in utero infection with PRRSV. In: **Proceedings 15th IPVS Congress**.Birmingham. England July 5-7: 133. 1998.
- [9] HALBUR, P.G.; MILLER, L.D.; PAUL, P.S.; MENG, X.; HUFFMAN, E.L. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) antigen in heart and lymphoid tissue of three-week-old colostrum deprived pigs. **Vet. Pathol.** 32: 200-204. 1995.
- [10] HAYNES, J.S.; HALBUR, P.J.; SIRINARUMITR, T. Temporal and characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. **Vet. Pathol.** 34: 39-44. 1997.
- [11] LA ROCHELLE, R.; MAGAR, R. Detection of PRRS virus in paraffin-embedded tissues. In: **Proceedings of 14th IPVS Congress**. Bologna.Italia.July 7-10: 77.1996.
- [12] LUNA, L.G. **Manual of histhological staining methods of the Armed Forces**. Institute of Pathology. III Edit. Mc.Graw Hill. New York: 33-95. 1968.
- [13] MEDINA DE L, N. Clínica y lesiones en encefalomiocarditis porcina y síndrome respiratorio porcino. En: **VII Congreso Nacional SOVVEC** Barquisimeto. Venezuela. 30 de Septiembre- 3 de Octubre: 74-79. 1996
- [14] MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.; Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. **J. Vet. Diagn Invest.** 7: 3-16. 1995.
- [15] MOLITOR, T.W.; XIAO, J.; CHOI, C.S. PRRS virus infection of macrophages: regulation by maturation and activation state. In: **Proceedings of American Association of Swine Practitioners**. 27th Annual Meeting, Nashville.TN. Sept 7: 563-569. 1996.
- [16] PRIETO, C.; SANCHEZ, R.; MARTIN-RILLO, S.; SUAREZ, P.; SIMARRO, I. SOLANA, A.; CASTRO, J.M. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory virus. **The Veterinary Record.** 1: 536-539. 1996.
- [17] PRIETO, C.; SUAREZ, P.; SIMARRO, I.; MARTIN-RILLO, S.; CASTRO, C. Insemination of susceptible and premunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Theriogenology** 47: 647-654.1997.
- [18] PRIETO, C.; SUAREZ.; SIMARRO, I; GARCIA, C.; FERNANDEZ, A.; CASTRO. J.M. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. **Veterinary Microbiology.** 57: 301-311. 1997.
- [19] ROLO, M.; LOPEZ, N.; PALENCIA, L.; SIFONTES, S.; MARTINEZ, J.; SANDOVAL, A. The seroprevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Venezuela. In: **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham. England. July 5-7: 314. 1998.
- [20] ROSSOW, K.D. Porcine reproductive and respiratory syndrome. **Vet Pathol.** 35: 1-20. 1998.
- [21] SHIN, J.; MOLITOR, T.W. PRRSV infection of immune-privileged sites. In: **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham.England. July 5-7: 318. 1998.

- [22] VAN ALSTING, W.G.; DE KLUVER, E.P.; POL, J.M. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory virus. **Swine Health Prod.** 1: 24-28. 1993.
- [23] YOON, K.J.; ZIMMERMAN, J.J.; SWENSON, S.L. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. **J. Vet. Diagn. Invest.** 7:305-312.1995.
- [24] ZIMMERMAN, J.; YOON, K.J.; WILLS, R.W.; SWENSON, S.L. General overview of PRRS virus: a perspective from the United States. **Vet Microbiol.** 55: 187-196. 1997.