

INDAGINI *IN SITU* SULLA PATOLOGIA INTESTINALE DEL SUINO: RISULTATI PRELIMINARI DA UN PERCORSO DIAGNOSTICO PER *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

IN SITU INVESTIGATION ON SWINE ENTERIC PATHOLOGY: PRELIMINAR DATA FROM A DIAGNOSTIC PATHWAY FOR LAWSONIA INTRACELLULARIS

D'ANNUNZIO G.^{1,3}, OSTANELLO F.¹, JACUMIN N.², LEOTTI G.², TOMMASINI N.², ALBORALI G. L.³, TONNI M.³, FORMENTI N.³, LUPPI A.³, VIO D.⁴, CAPUCCHIO M.T.⁵, PEROTTI M.⁵, ZOPPI S.⁶, GIORGIUTTI M.⁷, MANDRIOLI L.¹, SARLI G.¹

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

³Boehringer Ingelheim Animal Health Italia SpA

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

⁵Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli studi di Torino

⁶Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

⁷Veterinario libero professionista Friuli Venezia Giulia

Parole chiave: *Lawsonia intracellularis*, PCV2, immunoistochimica

Keywords: *Lawsonia intracellularis*, PCV2, immunohistochemistry

RIASSUNTO

Le patologie enteriche del suino sono caratterizzate da infezioni multiple che provocano modelli clinici complessi in cui non è facile oggettivare l'eziologia. L'istologia può contribuire alla diagnosi co-localizzando l'agente eziologico all'interno delle lesioni che produce. Nell'ambito della valutazione preliminare di un percorso diagnostico per *Lawsonia intracellularis* (LI), sono stati esaminati 3 tipologie di campioni: a) casi clinici di malattia, b) campioni prelevati in azienda da soggetti con sindrome enterica e c) campioni prelevati al macello in caso di sospetto di presenza di forme subcliniche. Il percorso diagnostico ha previsto uno screening iniziale con PCR qualitativa per LI per selezionare i casi da sottoporre a conferma mediante istologia (evidenza di iperplasia delle cripte dell'ileo) ed IHC (presenza di LI). L'accordo osservato fra i risultati dei 2 metodi è **risultato** del 70,0%; si è confermato il percorso diagnostico in 2/2 casi clinici, 6/17 casi con sindrome enterica suggestiva di enteropatia proliferativa (PE), 4/11 casi con sospetto di forma subclinica campionati al macello, tutti risultati preliminarmente positivi alla PCR. Sui campioni è stata condotta anche l'indagine immunoistochimica (IHC) per PCV2 che ha permesso di evidenziare deplezione linfocitaria nelle placche del Peyer e da moderata a lieve positività per PCV2 rispettivamente in 1/2 casi clinici e in 2/17 casi con sindrome enterica. È plausibile che forme gravi di patologia enterica possano essere correlate all'azione di patogeni in grado di impattare gravemente sulla funzionalità del sistema immunitario condizionando la patogenicità degli altri agenti in gioco. Risulta fondamentale l'applicazione di protocolli diagnostici *ad hoc* che conducano ad una diagnosi conclusiva permettendo l'impiego di misure di controllo e profilassi mirate.

ABSTRACT

Swine enteric diseases are characterized by multiple infections which are responsible for complex pattern of disease, and often it is not easy to objectify the etiology. Histopathology can aid in diagnosis by allowing co-localization of the causative agent within the lesions it produces. The preliminary results of a diagnostic pathway for *Lawsonia intracellularis* (LI) infection

are presented. Caseload is from 3 contexts: 1) clinical cases of disease, 2) enteric disease with sampling on the farm or 3) sampling at the slaughterhouse in case of suspicion of subclinical forms. Immunohistochemical investigation (IHC) to PCV2 was also made. The diagnostic pathway involves an initial screening with qualitative PCR for LI to select those cases to be confirmed by histology (evidence of ileum's crypts hyperplasia) and IHC (presence of LI). The observed agreement between the 2 methods was 70,0%; diagnosis was confirmed in 2/2 clinical cases, 6/17 cases with enteric disease and 4/11 cases selected at the slaughterhouse that were preliminarily positive on PCR. The parallel investigation to PCV2 was able to highlight lymphocyte depletion in Peyer patches and moderate to mild positivity to PCV2 in 1/2 clinical cases and 2/17 cases with enteric disease, respectively. It is plausible that the action of pathogens capable of seriously impacting the functionality of the immune system might be responsible for more serious forms of disease, increasing the pathogenicity of the other agents involved. The application of ad hoc diagnostic protocols is essential to make a conclusive diagnosis that allows the implementation of targeted control and prophylaxis measures.

INTRODUZIONE

Le patologie enteriche rappresentano uno dei più importanti problemi nell'allevamento intensivo del suino, non solo in termini di perdite produttive ed economiche, ma anche perché direttamente correlate con il benessere animale e l'uso di antimicrobici. In allevamento le patologie enteriche sono spesso caratterizzate da infezioni multiple che, provocando modelli clinici di malattia complessi, rendono difficile l'identificazione e l'implementazione di misure di controllo efficaci¹. Nel post-svezzamento, gli agenti responsabili di forme diarroiche possono essere patogeni batterici, quali ceppi enterotossigeni di *E. coli* (ETEC), oppure, come nel caso della malattia degli edemi, ceppi di *E. coli* produttori di tossina Shiga (STEC). A questi si aggiungono, già nelle prime settimane di vita, patogeni virali e parassitari come rotavirus, cryptosporidi e coccidi. Nelle fasi di magronaggio ed ingrasso le patologie più importanti sono la salmonellosi, la dissenteria suina da *Brachyspira hyodysenteriae*, le spirochetosi da *Brachyspira* spp., l'enteropatia proliferativa (PE) da *Lawsonia intracellularis* e ascaridiosi¹.

Anche il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è associato a forme enteriche: la diarrea è uno dei possibili segni descritti nelle *Porcine Circovirus Associated Diseases* (PCVDs), sia in caso di forme sistemiche di malattia da PCV2, che nella forma clinica intestinale definita PCV2-enteric disease – PCV2-ED^{2,3}.

La comparsa di PCV2 e delle patologie ad esso associate nella prima decade del ventunesimo secolo, ha cambiato drasticamente i pattern di malattia nell'allevamento suinicolo, mostrando il potenziale patogeno di agenti endemici come effetto diretto dell'azione immunosoppressiva del PCV2¹. La compromissione delle difese immunitarie innate e adattative, che caratterizza l'infezione da PCV2⁴, si manifesta nell'ileo con alterazioni dell'immunità mucosale intestinale quali: variazioni nell'espressione di geni immuno-correlati, variazioni nell'assetto immunitario cellulare locale e nella produzione di IgA⁵. Il risultato è un potenziale dismicrobismo nonché la possibilità che si realizzino co-infezioni, tra cui quelle più comunemente riportate sono rappresentate da co-infezioni tra PCV2 e *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., e/o *L. intracellularis*⁶⁻⁹.

Le infezioni da *L. intracellularis* o da PCV2 sono entrambe associate a ritardo della crescita, deperimento, aumento della mortalità e diarrea nei suini svezzati, e sono caratterizzate da lesioni talvolta indistinguibili macroscopicamente, quali ileite e colite necrotizzante. Di conseguenza, soprattutto nelle co-infezioni, l'istopatologia e lo studio delle lesioni microscopiche sono uno strumento fondamentale per confermare il ruolo come reale patogeno (co-localizzazione agente-lesione) delle molteplici *noxae* biologiche coinvolte nei quadri di malattia⁷.

L'associazione tra PCV2 e *L. intracellularis* nell'eziologia di quadri enterici nel suino è nota sia nella patologia spontanea⁷ che in quella sperimentale⁹.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, mediante indagine istologica ed immunoistochimica, l'infezione e/o la co-infezione tra PCV2 e *L. intracellularis* su campioni di ileo di suini conferiti per sospetta enteropatia proliferativa da *L. intracellularis*.

MATERIALI E METODI

I campioni di tessuto esaminati in questo studio, e su cui sono state svolte le indagini istopatologiche ed immunoistochimiche, fanno parte di una casistica raccolta con la finalità di definire la fattibilità di un percorso diagnostico per enterite da *L. intracellularis* nel suino. Il percorso diagnostico comprende l'integrazione dei reperti istopatologici con i risultati degli esami biomolecolari qualitativi (PCR/RT-PCR) per *L. intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* su pool di feci e su campioni di tessuto eseguiti dai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali delle Venezie (IZSVE) e della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER). Sulla base dell'anamnesi il prelievo dei campioni poteva riguardare soggetti con sospetto di forma clinica di PE, oppure essere applicato in caso di sindromi enteriche in allevamento o in caso di sospetto diagnostico di forme subcliniche con campionamento al macello (per quest'ultima categoria inclusa, è stata eseguita PCR qualitativa per *L. intracellularis* dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – IZSTO).

La casistica di questo studio preliminare di fattibilità del percorso diagnostico è rappresentata da 30 campioni di ileo di cui 2 provenienti da casi clinici di enteropatia proliferativa emorragica (PHE), 17 campionati in allevamento da suini con sintomatologia diarroica indicativa di infezione da *L. intracellularis* e/o scarso accrescimento e 11 casi con sospetto di forma subclinica campionati al macello.

Istologia e immunoistochimica (IHC)

I campioni di tessuto sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente processati ed inclusi in paraffina. Da ciascun campione di ileo sono state quindi ricavate sezioni di 3 micron di spessore, successivamente colorate con ematossilina eosina per l'allestimento del preparato istologico. In parallelo, altre due sezioni di ciascun campione sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica rispettivamente per *L. intracellularis* e PCV2. I dettagli del protocollo immunoistochimico utilizzato, riguardanti inibizione delle perossidasi, smascheramento dei siti antigenici e diluizione d'uso degli anticorpi primari impiegati sono riportati in Tabella 1. La reazione antigene-anticorpo è stata evidenziata utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina (0,04% per 2').

Come controlli positivi sono stati impiegati rispettivamente una sezione di ileo precedentemente individuato come positivo per la presenza di *L. intracellularis*, ed una di linfonodo positivo alla prova IHC per PCV2.

In tutte le prove IHC è stata inserita una sezione di ileo di suino utilizzato come controllo negativo impiegando un anticorpo dello stesso isotipo degli anticorpi primari (IgG1) ma di irrilevante specificità.

Tabella 1. Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi.

Table 1. Immunohistochemistry (IHC), material and methods.

Ab primario	Tipo, Clone	Ditta	Diluizione/ incubazione	Smascheramento siti antigenici
<i>L. intracellularis</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i> Supernatant of A ₁ 8B ₁ ¹⁰	DTU-VET	1:200/ overnight 4°C	-
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG ₂ a Anti-VP2 PCV2	Ingenasa, Madrid, Spain	1:1500/ overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C

La gravità delle lesioni microscopiche osservate è stata valutata applicando dei sistemi di *grading* secondo quanto riportato in letteratura ⁹. Ad ogni sezione di ileo è stato assegnato un punteggio per la presenza di infiltrato infiammatorio nella mucosa (0, normale; 1, lieve infiltrato cellulare prevalentemente di tipo linfo-istiocitario; 2, moderato infiltrato con coinvolgimento della sottomucosa; 3, grave infiltrazione cellulare di mucosa e sottomucosa); per l'iperplasia delle cripte intestinali caratteristica dell'infezione da *L. intracellularis* (0, normale; 1, lieve iperplasia delle cripte; 2, moderata iperplasia; 3, grave iperplasia delle cripte con o senza erniazione delle cripte nella sottomucosa) ed infine per la deplezione linfocitaria nelle placche del Peyer, tipica dell'infezione da PCV2 (0, normale; 1, deplezione delle placche del Peyer; 2, deplezione delle placche del Peyer e sostituzione con infiltrato istiocitario; 3, deplezione, sostituzione con infiltrato istiocitario e presenza di cellule multinucleate).

La reazione immunostochimica per *L. intracellularis* è stata considerata positiva in caso di presenza di materiale granulare di colore bruno nel citoplasma apicale delle cellule delle cripte intestinali e/o nel citoplasma di macrofagi nell'interstizio della mucosa intestinale. Questo segnale, indicante la presenza dell'antigene di *L. intracellularis*, è stato valutato tramite *grading* semiquantitativo attribuendo un punteggio da 0 a 3 (0, assenza di segnale; 1, segnale focale; 2, segnale multifocale di moderata entità; 3, segnale esteso) sulla base della gravità e dell'estensione della positività per *L. intracellularis* ^{7,11}. Per PCV2, la prova è stata valutata positiva in caso di colorazione marrone del citoplasma di cellule dendritiche centro-follicolari nelle placche del Peyer e/o di macrofagi nella lamina propria della mucosa, applicando un punteggio da 0 a 3 (0, negativo; 1, cellule con colorazione dell'antigene PCV2 in meno del 10% dei follicoli linfoidi; 2, cellule con colorazione dell'antigene PCV2 nel 10-50% dei follicoli linfoidi; 3, cellule con colorazione positiva per l'antigene PCV2 in più del 50% dei follicoli linfoidi) ^{9,12}.

Batteriologia e indagini biomolecolari

La casistica ha origini eterogenee che riflettono la diversità di approccio diagnostico intrapreso. Per gli 11 campioni prelevati al macello erano disponibili solo i risultati della PCR qualitativa per *L. intracellularis*. Gli altri casi sono stati sottoposti ad esami collaterali batteriologici per i principali *E. coli* patogeni del suino e/o biomolecolari aggiuntivi. Oltre alla PCR su pool di feci e su campioni di intestino per *L. intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e (solo per i campioni provenienti dall'IZSVe) per rotavirus, i polmoni di alcuni animali (9/19) sono stati esaminati per la ricerca di PRRSV e PCV2 con PCR quantitativa.

RISULTATI

I risultati della *grading* delle lesioni istologiche e delle prove immunostochimiche per *L. intracellularis* e PCV2 sono riportati in Tabella 2, da cui si evince, in tutti i casi esaminati, un obiettivo quadro di grave enterite (valore mediano dell'infiltrato infiammatorio pari a 3 su una scala 0-3), con un grado elevato di iperplasia delle cripte (anche per questo parametro valore mediano pari a 3 su una scala 0-3), associati ad una moderata deplezione linfocitaria del tessuto linfoide (valore mediano 2 su una scala 0-3).

Analizzando separatamente i risultati in funzione della tipologia di campione (caso clinico, campioni da soggetti provenienti da azienda con sintomatologia enterica, campioni dal macello), la positività immunostochimica per *L. intracellularis* è stata dimostrata in entrambi i due campioni di ileo conferiti con indicazione di caso clinico di enteropatia proliferativa emorragica (Figura 1). In questi casi, all'esame microscopico la mucosa dell'ileo appariva gravemente infiltrata da numerosi linfociti, plasmacellule ed istiociti frammisti ad eritrociti stravasati (emorragia) ed ispessita per la moderata/grave iperplasia delle cripte intestinali, con multifocale erniazione delle stesse nella sottomucosa (Figura 2). In uno dei due casi di

enteropatia proliferativa emorragica è stata evidenziata deplezione linfocitaria e sostituzione con cellule istiocitarie nelle placche del Peyer. Questo stesso caso è risultato positivo anche per la colorazione dell'antigene PCV2, rivelato con IHC multifocalmente in più del 10% dei follicoli linfoidi e nei macrofagi nella lamina propria (Figura 3).

Tabella 2. Risultati del *grading* delle lesioni istologiche e delle prove immunohistochimiche per *L. intracellularis* e PCV2.

C, caso clinico; A, caso campionato in allevamento; M, caso campionato al macello; IHC, immunohistochimica; -, non determinabile.

Table 2. Scoring of histological lesions and immunohistochemical results for *L. intracellularis* and PCV2.

C, clinical case; A, sampling on the farm; M, sampling at the slaughterhouse; IHC, immunohistochemistry; -, not evaluable.

Score clinico	num. campione	Grading			IHC per	
		infiltrato infiammatorio	iperplasia delle cripte	deplezione linfoide	<i>L. intracellularis</i>	PCV2
C	AP20427	3	3	2	1	2
C	AP24700	3	2	-	3	0
A	AP21360	3	3	1	1	0
A	AP23254	3	3	0	2	1
A	AP23255	3	3	2	1	1
A	AP23559	3	3	1	1	0
A	AP25007	3	3	1	1	0
A	AP25008	3	3	1	1	0
A	AP20814	0	1	0	0	0
A	AP20815	2	2	0	0	0
A	AP20854	2	1	2	0	0
A	AP20524	3	3	2	0	0
A	AP23560	3	3	2	0	0
A	AP24531	3	2	3	0	0
A	AP24532	3	2	2	0	0
A	AP24771	1	2	2	0	0
A	AP24772	1	1	1	0	0
A	AP25380	3	1	2	0	0
A	AP25453	3	2	2	0	0
M	83/22	3	3	2	0	0
M	84/22	3	2	2	0	0
M	85/22	3	3	1	0	0
M	86/22	3	3	2	0	0
M	87/22	3	3	2	1	0
M	88/22	3	3	1	1	0
M	89/22	3	3	1	1	0
M	90/22	3	3	2	1	0
M	91/22	3	3	2	0	0
M	92/22	3	3	2	0	0
M	93/22	3	3	1	0	0

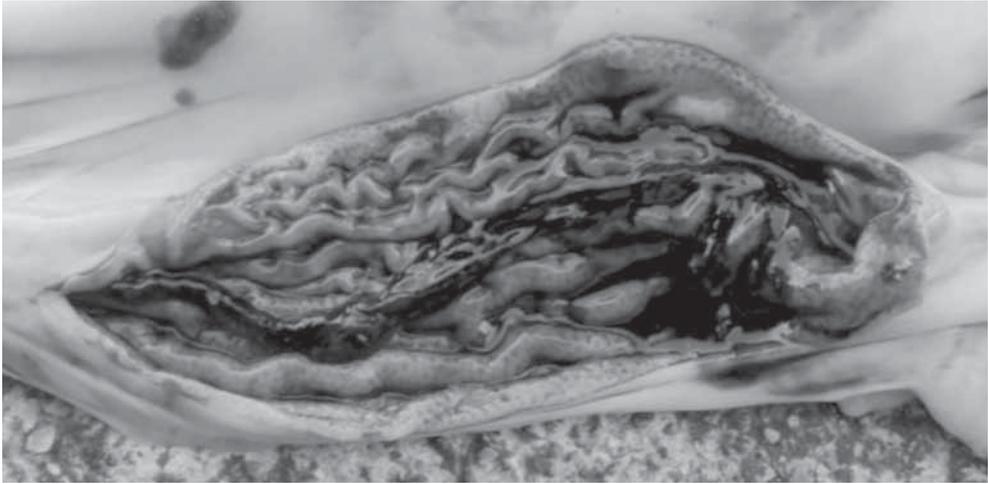


Figura 1. Aspetto macroscopico dell'ileo in uno dei casi clinici di enteropatia proliferativa emorragica (PHE), caratterizzata da ispessimento della mucosa e coaguli di sangue nel lume.
Figure 1. Gross lesion consistent with clinical case of proliferative hemorrhagic enteropathy (PHE). Grossly, PHE is characterized by mucosal thickening and lumen filled with blood clots.

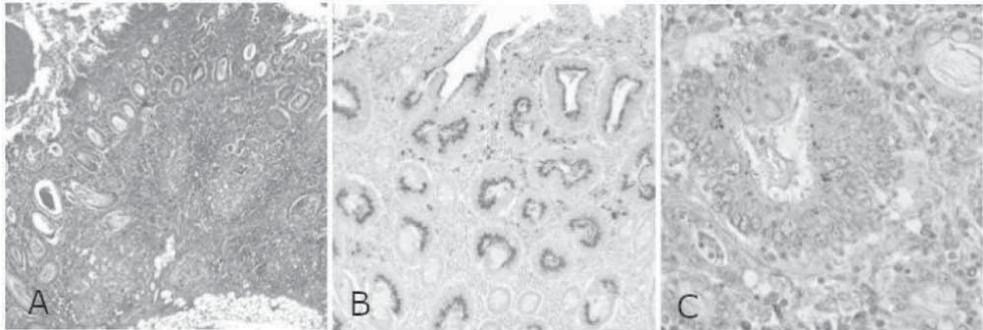


Figura 2. A) iperplasia di grado 3 con erniazione delle cripte intestinali nella sottomucosa; EE, 40x. B) positività di grado 3 per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali; IHC, 100x; C) dettaglio della positività per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali iperplastiche; IHC, 400x.
 EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

Figure 2. A) crypt hyperplasia score 3: marked hyperplasia with crypt herniation in submucosal layer; HE, 40x. B) positive cytoplasmic staining for L. intracellularis within crypt epithelial cells, score 3; IHC, 100x; C) detail of positive cytoplasmic staining for L. intracellularis within hyperplastic epithelial cells of the intestinal crypt; IHC, 400x. HE, hematoxylin eosin; IHC, immunohistochemistry.

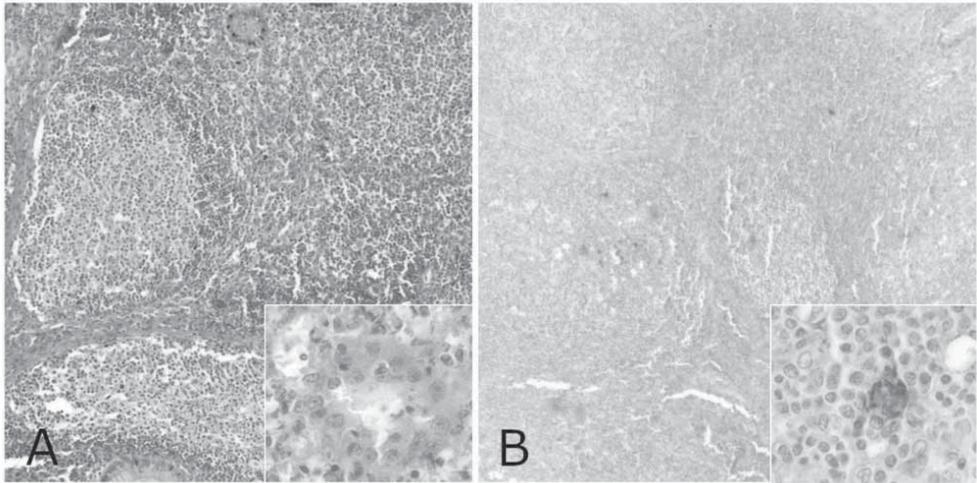


Figura 3. A) Deplezione linfoide di grado 2, con sostituzione del centro dei follicoli da parte di cellule istiocitarie; EE, 100x; inserto: dettaglio della presenza di istiociti al centro dei follicoli. B) positività centrofollicolare per PCV2, grado 2; IHC, 40x; inserto: dettaglio di positività citoplasmatica al PCV2 in una cellula centrofollicolare. EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

Figure 3. A) lymphoid depletion score 2: lymphocytes replaced by histocytes in the center of follicles; HE, 100x; insert: detail of histiocytes. B) positive staining for PCV2 antigen in a follicle, score 2; IHC, 40x; insert: detail of positive cytoplasmic staining to PCV2 antigen in a follicular cell.

HE, hematoxylin eosin; IHC, immunohistochemistry.

L'iperplasia delle cripte e il grado di infiltrazione di cellule infiammatorie nella mucosa è risultato essere prevalentemente di grave/moderata entità nei casi con sindrome enterica e/o sospetti di forma subclinica di enteropatia proliferativa. Rispettivamente, sono risultati positivi a *L. intracellularis* 6 dei 17 (35,3%) campioni di ileo prelevati da soggetti provenienti da allevamenti con diarrea e sospetto di forma subclinica di PE, e 4 degli 11 (36,4%) campioni di ileo prelevati al macello; in entrambe le situazioni, il punteggio mediano della positività per *L. intracellularis* è risultato pari a 1.

La valutazione della deplezione linfoide nei casi con anamnesi di infezione subclinica da *L. intracellularis* ha evidenziato un grado di deplezione linfocitaria da lieve/moderata in tutti i casi, e grave deplezione ma presenza di cellule multinucleate solo in un caso. I casi campionati al macello mostravano un grado di deplezione linfoide sempre di grado 1 o 2.

La co-infezione di *L. intracellularis* con PCV2 nei casi con sindrome enterica suggestivi di enteropatia proliferativa è stata dimostrata in due casi, nei quali è stato rivelato, mediante IHC, l'antigene PCV2 al centro dei follicoli linfoidi e multifocalmente nella lamina propria (grado 1).

Dai risultati degli esami batteriologici e biomolecolari, per la maggior parte dei casi è emerso un quadro di positività a più di un agente eziologico virale e/o batterico tra cui: *E. coli* emolitico, *E. coli* enterotossico (ETEC), Rotavirus tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A, PCV2, PRRSV.

Confrontando i dati dei risultati dell'IHC con quelli della PCR per *L. intracellularis* la concordanza osservata è risultata del 70,0% (95%CI: 50,6-85,3%) (Tabella 3). In particolare, considerando l'istologia come *gold standard*, dei 21 campioni positivi alla PCR, 12 sono stati confermati all'IHC; 7 dei rimanenti 9 campioni (PCR+/IHC-) sono stati prelevati al macello da animali in cui non vi era una sintomatologia clinica. Nessuno dei campioni positivi all'IHC è risultato negativo alla PCR e tutti i campioni negativi alla PCR lo erano anche all'IHC.

Tabella 3. Accordo osservato dei risultati IHC e PCR

Table 3. Observed agreement of IHC and PCR results

		IHC		
		+	-	
PCR	+	12 (a)	9 (b)	21
	-	0 (c)	9 (d)	9
		12	18	30 (n)

Nota: Accordo osservato= (a)+(d)/n= 12+9/30=70,0%

DISCUSSIONE

Mediante esame istologico, l'iperplasia delle cripte intestinali, lesione caratteristica dell'infezione da *L. intracellularis*, è stata osservata in tutti i casi sospetti di PE. Mediante IHC, la positività per l'antigene è stata dimostrata in 12 delle 30 sezioni di ileo esaminate. Sono risultati positivi all'IHC i 2 campioni provenienti dai 2 casi clinici, 4 degli 11 campioni prelevati al macello e 6 dei 17 campioni provenienti da allevamenti che presentava casi di diarrea e/o sospetto di forma subclinica di PE.

La PE può manifestarsi con forme cliniche diverse, da acute (nella forma di enteropatia proliferativa emorragica, *proliferative hemorrhagic enteropathy* – PHE) a croniche (adenomatosi intestinale o *porcine intestinal adenomatosis* – PIA), fino a forme subcliniche di infezione^{13,14}, che sono le più frequenti nonché le più subdole da diagnosticare poiché gli unici segni evidenti sono rappresentati da riduzione dell'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG), difformità di accrescimento nei gruppi ed aumento dei soggetti di scarto¹⁵.

Il sospetto clinico di PE è avvalorato dall'osservazione, all'esame *post-mortem*, delle lesioni macroscopiche caratteristiche della malattia rappresentate dall'ispessimento e sollevamento in pieghe della mucosa dell'ileo, che assume il cosiddetto aspetto "cerebroide", e a cui si aggiunge, nelle forme acute emorragiche, la presenza nel lume di coaguli di sangue frammisti a materiale fibrino-necrotico^{13,14}. Infine, la diagnosi definitiva è condotta mediante tecnica IHC, che rappresenta il test più affidabile per la diagnosi *post-mortem* di PE¹⁶ nonché il *gold standard* diagnostico, potendo mettere in evidenza la presenza dell'antigene di *L. intracellularis* nel contesto delle lesioni tipiche¹³.

Nel presente studio il sospetto clinico di forma acuta di PHE è stato confermato, mediante IHC e PCR, in entrambi i casi conferiti con anamnesi di diarrea emorragica.

Al macello, l'osservazione dell'ispessimento della mucosa dell'ileo in alcuni suini può far avanzare il sospetto che gli animali della partita siano stati interessati da patologie intestinali riconducibili all'azione di *L. intracellularis* nel corso del loro ciclo produttivo. Negli animali da noi esaminati, i risultati dell'esame istologico e dell'immunoistochimica hanno confermato la diagnosi di adenomatosi intestinale (PIA) da *L. intracellularis* in 4 degli 11 animali campionati al macello.

Per quanto riguarda i casi con sindrome enterica sospetta PE, 6 dei 17 animali sono risultati positivi per *L. intracellularis* sia in IHC che in PCR, mentre per due suini positivi in PCR la diagnosi non è stata conclusiva (IHC negativa) poiché non è stato possibile evidenziare l'antigene nelle cellule delle cripte intestinali, verosimilmente a causa della quantità di microorganismo inferiore al limite di sensibilità della metodica immunostochimica.

La PCR ha una maggiore sensibilità rispetto all'IHC e fornisce quindi risultati positivi in una maggiore proporzione di casi, identificando la presenza del genoma di *L. intracellularis* anche quando le quantità di microorganismo sono talmente basse da non essere verosimilmente la causa della patologia osservata. Al contrario, l'IHC fornisce un risultato positivo solo quando la quantità di *L. intracellularis* è rilevante e, quindi, è probabilmente la causa della patologia enterica osservata. Ne consegue che, dal punto di vista della diagnosi causale della patologia enterica osservata, l'esame IHC fornisce risultati più soddisfacenti.

In termini di specificità della diagnosi causale della patologia enterica riconducibile a *L. intracellularis* è quindi vantaggiosa l'esecuzione in serie dei due test: la PCR può essere utilizzata come tecnica di screening per identificare la presenza del microorganismo e, solo in caso di positività, i campioni saranno esaminati con l'istologia e l'immunostochimica per la conferma definitiva del ruolo rivestito da *L. intracellularis* quale reale agente causale della patologia enterica osservata, valutando la presenza/quantità dell'agente eziologico e la sua localizzazione all'interno delle lesioni (iperplasia delle cripte e/o enterite).

Tutti gli altri casi sospetti subclinici sono risultati negativi per *L. intracellularis* sia in IHC che con l'indagine biomolecolare ma l'esecuzione di indagini diagnostiche collaterali ha sempre potuto rilevare la positività ad uno o più agenti eziologici diversi, tra cui ceppi di *E. coli* (emolitico e/o ETEC) e tra gli agenti virali rotavirus, PRRSV e PCV2. La presenza di PCV2 nelle placche del Peyer dell'ileo è stata evidenziata con IHC in 3 casi di cui uno con grave enterite emorragica da PHE e gli altri 2 con forma enterica di PE, tutti contemporaneamente positivi per *L. intracellularis* nell'epitelio delle cripte. L'indagine PCR ha inoltre individuato la presenza del genoma di PCV2 e/o PRRSV in altri organi (polmoni) di 4 soggetti che presentavano ileo positivo per *L. intracellularis*.

La quasi totalità dei casi esaminati nel presente studio mostravano un certo grado di deplezione linfoide, registrato come di grado moderato/grave (2 / 3) nei casi di co-infezione dimostrata (con IHC o PCR) con PCV2 e/o PRRSV.

Entrambi questi virus sono in grado di interferire a vari livelli con il sistema immunitario e gran parte delle gravi conseguenze sanitarie ed economiche negli allevamenti suinicoli è legato proprio alla loro capacità di modulare le difese dell'ospite e di alterare le capacità di difesa dell'organismo nei confronti di altri agenti patogeni¹⁷.

Il presente studio avvalorava l'ipotesi che l'infezione da parte di agenti eziologici che determinano immunosoppressione (es. PCV2 e PRRSV), possa favorire la co-infezione con altri agenti patogeni ubiquitari compresa, come qui dimostrato con tecniche istopatologiche, *L. intracellularis*. Peraltro la segnalazione dell'associazione PCV2 con *L. intracellularis* è già nota in letteratura^{7,9}.

I risultati ottenuti confermano che la complessità delle relazioni tra diversi patogeni coinvolti possa condizionare la possibilità di giungere ad una diagnosi conclusiva di malattia. In molte situazioni, dove un risultato di PCR qualitativa non sempre può essere associato ad una diagnosi di malattia, lo studio delle lesioni microscopiche con il supporto dell'IHC permette invece di oggettivare il ruolo svolto nel processo patologico in atto da parte di un determinato agente patogeno, qualora sia possibile co-localizzare l'agente nel contesto delle lesioni caratteristiche da esso causate.

CONCLUSIONI

Le malattie enteriche del suino, come quelle respiratorie, sono patologie complesse e spesso caratterizzate dalla contemporanea presenza di uno o più agenti microbici. Come emerso dai risultati di questo studio, spesso è possibile riscontrare la presenza contemporanea di più agenti eziologici, associati a forme cliniche diverse. È plausibile che forme più gravi di patologia intestinale possano essere correlate all'azione di patogeni in grado di impattare gravemente sulla funzionalità del sistema immunitario condizionando la patogenicità degli altri agenti in gioco, come ampiamente dimostrato in letteratura per patogeni quali PCV2 e PRRSV. Se da una parte rimane quindi cruciale l'applicazione di piani di profilassi in un'ottica di riduzione dell'uso degli antimicrobici in azienda, è fondamentale l'applicazione di protocolli diagnostici *ad hoc* che conducano ad una diagnosi conclusiva permettendo l'impiego di misure di controllo e profilassi mirate.

I risultati di questo studio preliminare di fattibilità del percorso diagnostico per enterite proliferativa da *L. intracellularis* ribadiscono l'importanza dell'istopatologia come tecnica diagnostica d'elezione per la diagnosi di PE, e la necessità di impiegarla in affiancamento ad altri esami di laboratorio. Lo studio e l'interpretazione delle lesioni osservate nel processo patologico in atto possono fornire informazioni utili a stabilire il ruolo che i diversi agenti eziologici messi in evidenza hanno nel determinismo di patologie complesse come le enteropatie del suino.

BIBLIOGRAFIA

1. Thomson, J. R. & Friendship, R. M. (2019) "Digestive System" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 234–263.
2. Baró, J., Segalés, J. & Martínez, J. (2015) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: An independent condition or part of the systemic disease?" *Vet Microbiol* 176, 83–87.
3. Segalés, J. (2012) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis" *Virus Res* 164, 10–19.
4. Darwich, L. & Mateu, E. (2012) "Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2)" *Virus Res* 164, 61–7.
5. Shi, F., Li, Q., Zou, Z., Wang, Y., Hou, X., Zhang, Y., Song, Q., Zhou, S., & Li, H. (2020) "The changes of immune-related molecules within the ileal mucosa of piglets infected with porcine circovirus type 2" *J Vet Sci* 21, e78.
6. Järveots, T., Saar, T., Põdersoo, D., Rüütel-Boudinot, S., Sütt, S., Tummeleht, L., Suuroja, T., & Lindjärv, R. (2016) "Lawsonia intracellularis and Porcine Circovirus type-2 infection in Estonia" *Pol J Vet Sci* 19, 291–301.
7. Jensen, T. K., Vigre, H. & Svensmark, B. Å. (2006) "Distinction between Porcine Circovirus Type 2 Enteritis and Porcine Proliferative Enteropathy caused by Lawsonia intracellularis" *J Comp Pathol* 135, 176–182.
8. Takada-Iwao, A., Nakanishi, M., Souma, J., Chikata, S., Okuda, Y., Imai, Y., & Sato, S. (2011) "Porcine circovirus type 2 potentiates morbidity of Salmonella enterica serovar Choleraesuis in Cesarean-derived, colostrum-deprived pigs" *Vet Microbiol* 154, 104–112.
9. Opriessnig, T., Madson, D. M., Roof, M., Layton, S. M., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2011) "Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with Lawsonia intracellularis or Salmonella typhimurium" *J Comp Pathol* 145, 261–270.
10. Boesen, H. T., Jensen, T. K., Møller, K., Nielsen, L. H. & Jungersen, G. (2005) "Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of porcine proliferative enteropathy" *Vet Microbiol* 109, 105–12.

11. Johansen, M., Nielsen, M., Dahl, J., Svensmark, B., Bækbo, P., Kristensen, C. S., Hjulsgaard, C. K., Jensen, T. K., Ståhl, M., Larsen, L. E., & Angen, O. (2013) "Investigation of the association of growth rate in grower-finishing pigs with the quantification of *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus type 2" *Prev Vet Med* 108, 63–72.
12. Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2004) "Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2" *Vet Pathol* 41, 624–640.
13. Vannucci F.A., Gebhart C.J., M. S. (2019) "Proliferative enteropathy" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 891–911.
14. Lawson, G. H. K. & Gebhart, C. J. (2000) "Proliferative Enteropathy" *Jf Comp Pathol* 122, 77–100.
15. Karuppanan, A. K. & Opriessnig, T. (2018) "Lawsonia intracellularis : Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs" *Front Vet Sci* 5, 1–11.
16. Campillo, M., Smith, S. H., Gally, D. L. & Opriessnig, T. (2021) "Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs" *J Vet Diagn Invest* 33, 621–631.
17. Chase, C. & Lunney, J. K. (2019) "Immune System" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 264–291.