

SU UN CASO DI PORPORA TROMBOCITOPENICA ISOIMMUNE IN SUINETTI NEONATI

ISOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA IN NEONATAL PIGLETS: A CASE REPORT

GALLETTI E.¹, MERIALDI G.¹, ANTONELLI A.², BRINI E.³, FUSARO L.⁴,
SARLI G.⁴, FONTANA M.C.¹, MARTELLI P.⁵

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e
dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"-Sezione di Bologna;*

² *Veterinario Libero Professionista;*

³ *Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna;*

⁴ *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna;*

⁵ *Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.*

Parole chiave: emorragie, neonati, malattia da isoimmunizzazione, porpora trombocitopenica, anemia

Key words: haemorrhages, isoimmune diseases, thrombocytopenic purpura, anemia

Riassunto. Gli Autori descrivono un caso clinico di sindrome emorragica caratterizzata da petecchie, ecchimosi, emorragie multiple e mortalità che ha coinvolto i suinetti neonati di un allevamento a ciclo chiuso.

I casi si sono verificati nel periodo da maggio 2008 a gennaio 2009 ed hanno interessato 28 nidi. Su un totale di 322 suinetti nati vivi, 55 hanno manifestato sintomatologia e 25 sono deceduti per l'evoluzione della sindrome emorragica. L'esame clinico degli animali è stato affiancato da accertamenti diagnostici quali l'esame emocromocitometrico su alcuni soggetti colpiti dalla sindrome emorragica, esami anatomopatologici, istopatologici, microbiologici ed accertamenti tossicologici sui soggetti deceduti. Gli accertamenti di laboratorio hanno evidenziato una grave trombocitopenia con aumento dei reticolociti circolanti.

Sulla base dei rilievi anamnestici, clinici e delle indagini di laboratorio è stata formulata una diagnosi di porpora trombocitopenica isoimmune. Vengono discussi gli elementi diagnostico-differenziali.

Abstract. The Authors describe a case report of an haemorrhagic syndrome characterised by multiple haemorrhages, spontaneous petechiae and ecchymoses that occurred in a farrow to finish pig herd. The clinical signs appeared between May 2008 to January 2009 and occurred in 28 litters. Upon a total of 322 piglets, fifty-five showed haemorrhagic symptoms and 25 died. Gross pathology, histopathology, microbiological and toxicological exams were carried out in order to identify the ethiology of the disorder. Haematological parameters of six affected piglets were determined. The affected animals showed severe thrombocytopenia and an increased number of retics cells. The results of the laboratory investigations were suggestive of isoimmune thrombocytopenic purpura and allowed to exclude an haemolytic disease.

INTRODUZIONE

La riduzione del numero di piastrine è tra le cause più comuni di emorragia negli animali. La trombocitopenia è una patologia complessa che può riflettere quadri di diminuita produzione, distruzione accelerata, sequestro anomalo o eccessiva perdita extracorporea di piastrine per cause traumatiche, infettive, neoplastiche, tossiche o immunitarie (Catalafamo e Dodds, 1988).

La porpora trombocitopenica neonatale isoimmune dei suinetti è stata descritta per la prima volta in Norvegia nel 1963 da Stormorken et al.; successivamente, vengono segnalati episodi sporadici (Nordstoga, 1965; Lie, 1968; Saunders e Kinch, 1968; Dimmock et al., 1982; Forster, 2007). Tale entità presenta un'incidenza molto bassa, inferiore all'1%, e si manifesta con maggior frequenza nei suini Large White e Landrace, di norma, in soggetti nati da scrofe al secondo parto e oltre. I connotati clinici sono parzialmente condivisi dalla malattia emolitica neonatale che si manifesta nei primi giorni di vita con anemia e ittero (Taylor, 2006). Alcuni Autori hanno riportato casi di malattia emolitica neonatale associati a porpora trombocitopenia isoimmune (Linklater et al., 1973; Hall et al., 1972). L'eziologia delle due malattie riconosce una eziologia su base immunitaria con produzione di anticorpi verso gli antigeni piastrinici fetali o verso i globuli rossi. Gli anticorpi rivolti verso le cellule del sangue dei suinetti si sviluppano nella scrofa durante la gestazione; lo sviluppo di anticorpi è causato dalle caratteristiche antigeniche del verro utilizzato per la fecondazione che differiscono da quelle della scrofa.

Dal punto di vista clinico la porpora trombocitopenica è caratterizzata da emorragie multiple che si verificano allorquando il numero dei trombociti periferici scende al di sotto di 30.000-50.000/ μ l e evolve solitamente in maniera infausta per tutta o parte della nidiata in 14-30 giorni. Nella malattia emolitica neonatale il quadro clinico anemico si associa costantemente ad ittero, con evoluzione più rapida (morte a 2-3 giorni) (Taylor, 2006). La sintomatologia, da sola, è suggestiva della diagnosi anche se è necessario intraprendere un percorso diagnostico differenziale basato su accertamenti laboratoristici sul sangue (esami ematologici) nonché indagini *post-mortem*. , Nell'ambito di una diagnosi differenziale si impone la formulazione di sospetto diagnostico verso alcune infezioni setticemiche (*Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Streptococchi*) malattie virali (Peste suina classica) e avvelenamento da anticoagulanti.

Questa nota descrive un caso clinico di porpora emorragica neonatale ed i risultati degli accertamenti diagnostici che hanno permesso di formulare una diagnosi di porpora trombocitopenica isoimmune.

CASO CLINICO

Gli animali oggetto dello studio sono pervenuti da un allevamento a ciclo chiuso in cui si sono manifestati episodi di porpora emorragica nei suinetti lattanti nel periodo Maggio 2008 - Gennaio 2009. La sintomatologia è stata registrata su 28 figliate di 27 diverse scrofe, di cui solo due erano al primo parto. Le scrofe sono state fecondate utilizzando seme di verri aziendali. La pratica di inseminazione avveniva

per tre giorni consecutivi utilizzando, sulla stessa scrofa, dosi di seme ottenute anche da verri diversi. Tre nuovi verri sono entrati in produzione circa tre mesi prima della comparsa dei segni clinici.

I suinetti nati vivi sono stati 322 con una media di 11.5 suini per nidiata; cinquantacinque suinetti, hanno evidenziato dai primi giorni di vita quadri emorragici di diversa gravità. Il quadro clinico si caratterizzava per petecchie, ecchimosi ed emorragie sottocutanee diffuse; all'interno delle nidiate il numero medio di soggetti colpiti è stato pari a 1.96 ± 1.97 . In una nidiata, in particolare, sono stati colpiti 11 suini su 12. Venticinque di questi suinetti sono venuti a morte all'età di 3-4 giorni. All'interno delle nidiate il numero massimo di suini deceduti è stata di sei soggetti mentre in alcune nidiate colpite la mortalità è stata nulla.

ACCERTAMENTI DIAGNOSTICI DI LABORATORIO

Sei suinetti, pervenuti presso la Sezione di Bologna dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, sono stati sottoposti all'esame anatomopatologico. Da 3 soggetti di 4 giorni sono anche stati campionati rene, fegato, polmone, milza, cuore e midollo osseo per l'esame istologico (fissazione in formalina, inclusione in paraffina e colorazione con ematossilina-eosina di sezioni di 4 micronm). Su campioni di fegato, rene e milza è stato eseguito l'esame batteriologico mediante semina su Agar sangue e su Gassner agar.

Sugli organi in pool è stato condotto l'esame virologico mediante inoculazione su coltura cellulare ed è stata eseguita la ricerca del virus della PRRS tramite tecnica PCR. Data la presenza di lesioni emorragiche è stata inoltre effettuata la ricerca di cumarinici (Bromadiolone, Coumaclor, Coumafuryl, Coumatetralyl e Warfarin) tramite tecnica HPLC per verificare il possibile avvelenamento da tali sostanze.

Inoltre, da sei soggetti con lesioni di tipo emorragico e da tre soggetti clinicamente sani della stessa sala parto e della stessa età, è stato eseguito un prelievo di sangue venoso sottoposto ad esame emocromocitometrico completo presso il laboratorio centralizzato (SEPA VET) del Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna. L'esame di cui trattasi è stato effettuato tramite analizzatore Cell-Dyn 3500R (Abbott) e integrato da osservazione al microscopio ottico degli strisci di sangue previa colorazione May-Grumwald Giemsa e specifica al Blu cresile brillante per la conta reticolocitaria.

RISULTATI

L'esame anatomopatologico ha evidenziato in tutti i soggetti esaminati lesioni emorragiche diffuse alla cute, al sottocute e alle sierose. Le emorragie cutanee si presentavano come petecchie, soffusioni e spandimenti localizzati principalmente carico delle regioni della testa, dell'addome, dell'inguine e della faccia plantare del piede (Figura n. 1). Emorragie puntiformi sono state rilevate a carico del rene mentre i linfonodi si presentavano marcatamente emorragici. Inoltre, assai prevalente è apparsa



Figura 1: Emorragie cutanee alla regione addominale (A) e soffiusioni emorragiche alla faccia plantare del piede (B).

Figure 1: Abdominal skin (A) and foot sole haemorrhages

una infiltrazione emorragica del mesocolon e dell'epicardio. Nei soggetti sottoposti a prelievo ematico è stata procurata una imponente emorragia sottocutanea nell'area della puntura venosa di prelievo. L'esame istologico (fig.2) ha confermato la presenza di emorragie interstiziali nel cuore (sia a livello intramurale che, molto evidenti, a livello sub-endocardico (fig. 3a)), nei reni (sia a localizzazione sottocapsulare che corticale profonda e nel bacinetto (fig. 3b)), nel polmone e nel fegato. In quest'ultimo erano presenti numerose aree di emopoiesi extramidollare con una apprezzabile presenza di megacariociti (fig.3c), ben evidenti anche nel midollo osseo (fig. 3d). Nei polmoni era costantemente presente una polmonite interstiziale moderata multifocale.

Gli accertamenti microbiologici hanno dato esito costantemente negativo, parimenti a quelli tossicologici.

I risultati dell'esame emocromocitometrico sono riportati nelle tabelle 1 e 2. I valori di emoglobina, ematocrito ed eritrociti dei soggetti malati risultavano inferiori del 50% rispetto a quelli dei soggetti sani utilizzati come controllo. La media della conta piastrinica, in assenza di aggregati piastrinici, ha messo in evidenza una netta riduzione dei trombociti che risultano inferiori di 7 volte rispetto alla media dei soggetti sani. Nei soggetti colpiti dalla fenomenologia emorragica la media della percentuale dei reticolociti è risultata nettamente superiore (12.2%) rispetto a quella dei soggetti clinicamente sani (2.35%). Il volume corpuscolare medio (MCV) così come il valore della ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW) sono risultati superiori negli animali malati, mentre l'emoglobina corpuscolare media (MCH) e la concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media (MCHC) è risultata equiparabile tra i due gruppi. Inoltre, il rapporto tra le cellule nucleate del sangue (NRBC/100 WBC) è risultato più elevato nei soggetti malati rispetto ai sani. Relativamente alla morfologia eritrocitaria, nei soggetti malati, è stata evidenziata una marcata anisocitosi, policromasia e presenza di leptociti (essenzialmente cellule bersaglio).

Soggetti malati	1	2	3	4	5	6	Media
Emoglobina gr %	3.3	7	4.8	7.7	5.1	5.4	5.5
Ematocrito %	10.2	19.8	14.3	25.9	17	17.7	17.5
Eritrociti /mm ³	1420000	2640000	2000000	3990000	2600000	250000	2525000
Piastrine /mm ³	7400	104000	32700	38100	10800	8340	33557
Leucociti /mm ³	10100	7700	7900	4100	2300	5000	6750
MCV fL	72	75.1	71.3	64.9	65.5	70.7	69.9
MCHC gr %	32.3	35.6	34.2	29.8	30.5	30.8	32.2
MCH pgr	23.2	26.8	24.4	19.3	20	21.8	22.6
RDW %	21.8	25.1	22.4	21.3	20.2	21.7	22.1
NRBC/100 WBC	3	16	27	17	3	-	13.2
Reticolociti %	18.1	14.5	17.8	1.31	7.8	14	12.2
Linfociti /mm ³	2626	2772	3950	1722	828	2250	2358
Neutrofilii /mm ³	7373	4620	1501	1640	989	2150	3225
Eosinofili /mm ³	101	77	79	205	69	150	113.5

Tab. 1: Esame emocromocitometrico dei soggetti malati
Tab.1: Haematological parameters of affected animals

Soggetti sani	7	8	9	Media
Emoglobina gr %	8.6	10.2	9.1	9.3
Ematocrito %	26.4	30.8	27.4	28.2
Eritrociti /mm ³	4050000	4900000	4220000	4390000
Piastrine /mm ³	92400	359000	272000	241133
Leucociti /mm ³	5200	4600	4700	4833.3
MCV fL	65.1	62.8	65.1	64.3
MCHC gr %	32.9	33.2	33.2	33.1
MCH pgr	21.4	20.9	21.6	21.3
RDW %	19.2	18.4	19.9	19.2
NRBC/100 WBC	1	2	2	1.7
Reticolociti %	3.1	assenti	1.6	2.35
Linfociti /mm ³	1456	2070	1551	1692
Neutrofilii /mm ³	3484	2346	2773	2867
Eosinofili /mm ³	52	assenti	188	120

Tab. 2: Esame emocromocitometrico dei soggetti sani
Tab.2: Haematological parameters of healthy animals

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei dati anamnestici, clinici, dell'esame emocromocitometrico, delle osservazioni anatomo-istopatologiche, microbiologiche e tossicologiche effettuate sono state formulate ipotesi diagnostiche che sono state inserite in un percorso diagnostico differenziale volto a definire una diagnosi eziologica della sindrome emorragica osservata.

L'esito negativo degli esami batteriologici e virologici e della ricerca di anticoagulanti cumarinici ha escluso le possibili cause di natura infettive e tossica.

L'approfondimento del caso attraverso gli esami emocromocitometrici condotti su soggetti con sintomatologia e su soggetti apparentemente sani ha portato un contributo determinante ai fini diagnostici. La conta piastrinica sui soggetti malati ha evidenziato una marcata riduzione dei trombociti, in assenza di aggregati piastrinici, e un decremento dei valori di emoglobina, ematocrito ed eritrociti. Nei soggetti con sintomatologia, inoltre, la percentuale media dei reticolociti è risultata superiore al 12% rispetto alla media del 2,35% dei soggetti sani, sostenendo l'evidenza di un quadro di anemia rigenerativa in assenza di alterazioni eritrocitarie riconducibili a fenomeni emolitici. Tale dato è stato supportato dalla presenza nei soggetti malati di un valore alto di MCV, indice macrocitosi, e dal valore di RDW, o indice di anisocitosi, che permette di sospettare la presenza di eritrociti di dimensioni diverse tra loro, dato avvalorato peraltro dalla valutazione morfologica al microscopio ottico. Inoltre il rapporto tra le cellule nucleate del sangue (NRBC) è a favore delle degli eritroblasti, che rappresentano cellule rosse immature.

L'esclusione di malattie infettive, i dati di laboratorio (piastrinopenia marcata) e la coincidenza temporale dell'entrata in produzione di nuovi verri emersi dall'indagine anamnestica hanno quindi indirizzato il percorso diagnostico verso una patologia su base immunitaria. I danni alle piastrine ad eziologia immunitaria e il successivo decremento di tali cellule nel torrente circolatorio sono infatti tra le cause più frequenti di trombocitopenia negli animali (Catalafamo e Dodds, 1988).

La trombocitopenia isoimmune neonatale del suinetto origina dalla produzione di anticorpi materni verso gli antigeni della superficie delle piastrine fetali; gli anticorpi materni si legano agli antigeni delle piastrine dei neonati determinandone la prematura distruzione. La dimostrazione da parte di Andersen e Nielsen (1973) di agglutinine nel siero di scrofe madri di soggetti ammalati è stato il primo dato che ha supportato l'ipotesi dell'isoimmunizzazione come eziologia della porpora trombocitopenica neonatale dei suinetti. Come evidenziato da uno studio di Saunders e Kinch (1968) le agglutinine materne sono assenti nel siero dei suinetti prima dell'assunzione di colostro ma già con la prima poppata le agglutinine compaiono nel siero dei suinetti. Gli anticorpi che si legano alle piastrine durante questo periodo sono quindi responsabili sia del rapido decremento di tali cellule e pertanto delle diffuse emorragie che compaiono precocemente nei primi giorni di vita, sia della soppressione dei megacariociti che determina a un quadro di trombocitopenia più tardiva a manifesto a circa 2-3 settimane di età. La presenza di numerosi megacariociti, nelle aree di ematopoiesi sia midollare che epatica nei casi esaminati istologicamente nel corso del presente caso clinico, riflette la condizione iniziale della malattia (4 giorni), non essendosi raggiunto il tempo necessario per registrare anche la riduzione numerica dei megacariociti.

La marcata trombocitopenia in assenza di quadri diretti ed indiretti di eritrolisi hanno permesso di escludere una forma di anemia emolitica avvalorando la diagnosi di por-

pora trombocitopenica isoimmune. In base a tale diagnosi, a partire da Gennaio 2009, nell'allevamento in causa è stata modificata la pratica di inseminazione assicurando che ciascuna scrofa sia fecondata da un solo verro. Con le nuove nascite sarà quindi possibile raccogliere ulteriori dati e pervenire all'individuazione del verro ipoteticamente coinvolto nel processo patogenetico che sostiene la malattia isoimmunitaria diagnosticata e riportata nella presente segnalazione

Bibliografia:

- Catalafamo J.L., Dodds J.D. (1988) "Hereditary and acquired thrombopathias". *Vet Clin North Am: Small Animal Practice*. 18. (1). 185-193.
- Stormorken H., Svenkerud R., Slagsvold P., Lie H., Lundevall J. (1963) "Thrombocytopenic bleedings in young piglets due to maternal isoimmunization". *Nature*. 198. 1116-1117.
- Nordstoga K. (1965) "Thrombocytopenic purpura in baby pigs caused by maternal isoimmunization". *Path. Vet.* 2. 601-610.
- Lie H. (1968) "Thrombocytopenic purpura in baby pigs". *Acta vet. scand.* 9. 285-301.
- Saunders C.N., Kinch D.A. (1968) "Thrombocytopenic purpura of pigs". *J. Comp. Path.* 78. 513-525.
- Dimmock C.K., Webster W.R., Shiels I.A., Edwards C.L. (1982). "Isoimmune Thrombocytopenic purpura in piglets". *Aust Vet J.* 59. 157-159.
- Forster L. (2007) "Neonatal alloimmune Thrombocytopenia. purpura and anemia in 6 neonatal piglets". *CJV.* 48. 855-857.
- Taylor D.J. (2006) "Pig diseases" 8a ed.. Cambridge. Burlington Press.
- Ebbe S., Phalen E., Overcash J., Howard D., Stohlman Jr. (1971) "Stem cell response to thrombocytopenia. *J. lab. & Clin. Med.* 78. 872-881.
- Andersen S., Nielsen R. (1973) "Pathology of purpura thrombocytopenia in piglets". *Nord Vet Med.* 25. 210-219.
- Linklater K.A., McTaggart H.S., Imlah P. (1973) "Haemolytic disease of the newborn. thrombocytopenic purpura and neutropenia occurring concurrently in a litter of piglets. *Br. Vet. J.* 129. 36-46.