

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXXV

**Settore Concorsuale:** 07/H2 – PATOLOGIA VETERINARIA E ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/03 – PATOLOGIA GENERALE ED ANATOMIA PATOLOGICA VETERINARIA

DIAGNOSTICA ANATOMOPATOLOGICA NELLE MALATTIE  
INFETTIVE DEL SUINO: CO-LOCALIZZAZIONE AGENTI PATOGENI E  
LESIONI, LIMITI ED UTILITÀ

**Presentata da:** Dr.ssa Giulia D'Annunzio

**Coordinatore Dottorato**

Prof.ssa Carolina Castagnetti

**Supervisore**

Chiar.mo  
Prof. Giuseppe Sarli

**Esame finale anno 2023**

## Abstract

The intensification of pig farming in recent decades has led to important changes in the management of the herd with serious health implications. In modern production systems, health is impaired due to multifactorial diseases and the identification of the causal agent cannot be based exclusively on the result of a single diagnostic tool. Most pathogens are ubiquitous and part of the normal porcine microbiota, so the identification of an infectious agent suggests only a possible diagnosis.

Pathology, together with information on the clinical history, epidemiological data and the results of other diagnostic tools, plays a pivotal role in determining the causality in the diagnosis of infectious diseases. Histopathology allows to correlate the presence of the infectious agent with the characteristic microscopic lesions: based on the availability of antibodies or probes to detect respectively the presence of antigens or the genome of viruses or bacteria in histological sections, histopathology is useful for determining the causal link with the disease.

The introduction of this thesis is focused on the role of pathology in infectious diseases of swine. After a brief description of the necropsy technique, follows a discussion on the proper sampling for histopathological examination in the diagnosis of the three main syndromes in swine herds (respiratory diseases, enteric diseases and reproductive diseases).

The experimental section reports the results of diagnostic investigations in porcine pathology conducted on Porcine respiratory disease complex (PRDC) and on the porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*.

Both respiratory and enteric diseases represent major diagnostic challenges in pig herds. In the results on PRDC (chapter 2) many cases sampled for suspicion of a pure respiratory disease have been instead concluded as systemic diseases of PCV2 infection (PCV2-SD) thanks to appropriate sampling for the diagnosis of circovirus-associated diseases (PCVD). The study on proliferative enteropathy (chapter 3), defines a diagnostic pathway for proliferative enteropathy to improve the diagnostic accuracy thanks to the comparison between the results obtained from anatomopathological and histopathological investigations with biomolecular tests.

Chapter 4 describes the use of histopathology as an essential methodological component to evaluate the protective efficacy of vaccines in vaccine challenge studies. The chapter describes the results obtained in two subsequent trials to evaluate the efficacy of two experimental vaccines for PCV2, the first formulated with inactivated PCV2b strain administered at different doses of antigen; the second formulated with recombinant "Cap" antigen not assembled in virus-like particles (VLP).

## Riassunto

Il processo di intensificazione dell'allevamento suinicolo ha comportato grandi modifiche nel *management* aziendale con conseguenze importanti dal punto di vista sanitario. Nei moderni sistemi di produzione, i problemi sanitari sono spesso dovuti a malattie multifattoriali e "condizionate" ed individuare l'agente causale di una malattia non può basarsi esclusivamente sul risultato di un singolo test diagnostico, ancorché la maggior parte degli agenti patogeni sono ubiquitari e facenti parte del normale microbioma del suino: pertanto l'identificazione di un agente infettivo suggerisce solo una possibile diagnosi. L'anatomia patologica, integrata alle informazioni sulla storia clinica, ai dati epidemiologici e ai risultati di altri test diagnostici diretti ed indiretti, grazie allo studio macroscopico e alla caratterizzazione istologica delle lesioni, svolge un ruolo fondamentale nella determinazione della causalità di malattia nella diagnosi delle malattie infettive. In base alla disponibilità di anticorpi o sonde per rilevare la presenza di antigeni o del genoma di virus o batteri nelle sezioni istologiche, l'istopatologia si configura come metodica diagnostica utile per determinarne il nesso causale con la malattia, potendo correlare la presenza dell'agente infettivo con le lesioni microscopiche caratteristiche e oggettivando il ruolo degli agenti individuati nel determinismo di malattia.

Nella sezione introduttiva di questa tesi, dopo una breve disamina della tecnica necroscopica di base, seguono i dettagli per l'esecuzione di indagini diagnostiche secondo "approccio orientato al problema" in patologia suina, con le indicazioni sul campionamento per l'esame istopatologico ai fini della diagnosi di tre gruppi di malattie, riconosciute come tra quelle responsabili dei maggiori problemi in allevamento suinicolo: le patologie respiratorie, le patologie enteriche e la patologia riproduttiva.

Nella sezione relativa al contributo sperimentale, suddivisa in tre capitoli, nel capitolo 2 e 3 sono descritti gli studi di diagnostica istopatologica in patologia suina condotti rispettivamente nell'ambito del complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC) e dell'enteropatia proliferativa del suino da *Lawsonia intracellularis*. In entrambi questi casi si tratta di condizioni la cui diagnosi rappresenta una delle principali sfide in allevamento. Le patologie respiratorie ed enteriche sono affezioni multifattoriali e spesso dall'eziologia polimicrobica che provocano modelli clinici di malattia complessi, rendendo difficile l'identificazione e l'implementazione di misure

di controllo efficaci. Nello studio sul PRDC emerge che il campionamento non appropriato per la diagnosi di malattie associate al circovirus (PCVD) potrebbe portare a sottostimare il reale danno inferto dall'infezione da PCV2, dall'evidenza che molti casi di forme apparentemente respiratorie possono viceversa essere ricomprese in forme sistemiche di malattia da PCV2. Nello studio sull'enteropatia proliferativa viene invece definito un percorso diagnostico per l'enteropatia da *L. intracellularis* con lo scopo di migliorare l'accuratezza diagnostica grazie alla valutazione della concordanza tra test diagnostici nel confronto tra i risultati ottenuti dalle indagini anatomico-patologiche ed istopatologiche e quelli dei test biomolecolari. Nel capitolo 4 della tesi è descritto l'impiego dell'esame istopatologico come componente metodologica imprescindibile nello studio di efficacia vaccinale di formulazioni sperimentali per contrastare lo sviluppo di PCVD. Il capitolo descrive i risultati ottenuti in due successive sperimentazioni per la valutazione dell'efficacia di due vaccini sperimentali per PCV2, il primo formulato con PCV2b inattivato somministrato a diverso dosaggio di antigene nei 4 gruppi in esame; il secondo formulato con antigene ricombinante "Cap" non assemblato in *virus-like particles* (VLP).

# Indice

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>8</b>
<b>CAPITOLO 1. La diagnostica patologica <i>in situ</i> delle malattie infettive nel suino .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Le malattie infettive nell'allevamento intensivo del suino.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 L'esame necroscopico ed il campionamento mirato alla diagnosi istopatologica .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Tecnica necroscopica di base.....	19
<b>1.3 Approccio orientato al problema: le patologie respiratorie del suino.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Pattern macroscopici di polmonite.....	27
1.3.2 Istologia e co-localizzazione agente eziologico/lesioni.....	35
1.3.3 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie respiratorie del suino.....	42
<b>1.4 Approccio orientato al problema: le patologie enteriche del suino.....</b>	<b>43</b>
1.4.1 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie enteriche del suino.....	48
<b>1.5 Approccio orientato al problema: la patologia riproduttiva .....</b>	<b>49</b>
1.5.1 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie riproduttive del suino.....	52
<b>Bibliografia .....</b>	<b>56</b>

<b>CONTRIBUTO SPERIMENTALE.....</b>	<b>65</b>
-------------------------------------	-----------

## **CAPITOLO 2. Il Complesso delle Malattie Respiratorie del suino (PRDC):**

<b>Ruolo patologico del PCV2 e del PRRSV in una casistica italiana di PRDC....</b>	<b>66</b>
------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<b>2.1 Introduzione .....</b>	<b>66</b>
-------------------------------	-----------

<b>2.2 Materiali e metodi.....</b>	<b>73</b>
------------------------------------	-----------

2.2.1 Istologia ed immunoistochimica .....	73
--------------------------------------------	----

<b>2.3 Risultati.....</b>	<b>76</b>
---------------------------	-----------

<b>2.4 Discussione.....</b>	<b>86</b>
-----------------------------	-----------

<b>2.5 Conclusioni .....</b>	<b>91</b>
------------------------------	-----------

<b>Bibliografia .....</b>	<b>92</b>
---------------------------	-----------

## **CAPITOLO 3. L'enterite proliferativa da *Lawsonia intracellularis* nel suino..**

<b>3.1 Introduzione .....</b>	<b>100</b>
-------------------------------	------------

<b>3.2 Materiali e metodi.....</b>	<b>107</b>
------------------------------------	------------

3.2.1 Istologia ed immunoistochimica (IHC) .....	108
--------------------------------------------------	-----

3.2.2 Batteriologia e indagini biomolecolari .....	110
----------------------------------------------------	-----

<b>3.3 Risultati.....</b>	<b>110</b>
---------------------------	------------

<b>3.4 Discussione.....</b>	<b>115</b>
-----------------------------	------------

<b>3.5 Conclusioni .....</b>	<b>118</b>
------------------------------	------------

<b>Bibliografia .....</b>	<b>120</b>
---------------------------	------------

**CAPITOLO 4. L'istologia come *screening* per valutare l'efficacia vaccinale:  
stima della carica virale tissutale dopo vaccinazione ed esposizione**

<b>sperimentale.....</b>	<b>123</b>
--------------------------	------------

<b>4.1 Introduzione .....</b>	<b>123</b>
-------------------------------	------------

<b>4.2 Prova di vaccinazione 1: vaccino-PCV2 a virus intero inattivato.....</b>	<b>128</b>
---------------------------------------------------------------------------------	------------

4.2.1 Materiali e metodi.....	128
-------------------------------	-----

4.2.2 Risultati .....	133
-----------------------	-----

<b>4.3 Prova di vaccinazione 2: vaccino ricombinante a base di proteina ORF2 di PCV2b .....</b>	<b>140</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

4.3.1 Materiali e metodi.....	140
-------------------------------	-----

4.3.2 Risultati .....	143
-----------------------	-----

<b>4.4 Discussione.....</b>	<b>149</b>
-----------------------------	------------

<b>4.5 Conclusioni .....</b>	<b>155</b>
------------------------------	------------

<b>Bibliografia .....</b>	<b>156</b>
---------------------------	------------

# INTRODUZIONE

# CAPITOLO 1. La diagnostica patologica *in situ* delle malattie infettive nel suino

---

## 1.1 Le malattie infettive nell'allevamento intensivo del suino

L'allevamento del suino, con 150 milioni di capi allevati, rappresenta il settore zootecnico maggiormente sviluppato in Unione Europea (UE), sebbene con enormi differenze nei metodi di allevamento e nelle dimensioni delle aziende suinicole tra gli Stati membri, che vanno dai piccoli allevamenti familiari agli impianti industriali intensivi con migliaia di animali<sup>1</sup>.

In Italia, la suinicoltura è caratterizzata da consistenze molto elevate in termini di numero totale di capi allevati, con piccole differenze numeriche tra categorie produttive e con un dato stimato maggiore per i suini da ingrasso da 110 kg<sup>2</sup>, anche in virtù della vocazione italiana alla produzione di prodotti di trasformazione dal suino pesante e dei numerosi prodotti a base di carne suina DOP e IGP, soprattutto nelle regioni del Nord Italia, in cui si concentra la maggior parte dei sistemi intensivi di allevamento.

Complessivamente il processo di intensificazione dell'allevamento suinicolo, con l'introduzione di sistemi di produzione confinati e con l'aumento del numero di capi allevati all'interno delle singole unità produttive, ha comportato grandi modifiche nel *management* aziendale con conseguenze importanti dal punto di vista sanitario.

---

<sup>1</sup> [https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS\\_BRI\(2020\)652044](https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI(2020)652044). Consultato il 23/10/2022.

<sup>2</sup> [http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP\\_CONSISTENZE](http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP_CONSISTENZE). Consultato il 23/10/2022.

L'industrializzazione dell'allevamento del suino ha modificato il *trend* di malattie dovute ad agenti infettivi in allevamento, impattando sulla rilevanza di alcuni patogeni a scapito di altri e contribuendo, negli ultimi 30 anni, all'emergenza e alla diffusione di nuove malattie, come nel caso delle emergenti epidemie da sindrome da deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS) causata dal circovirus suino tipo 2 (PCV2), della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS) negli anni '90, e della diarrea epidemica suina (PED) da coronavirus nel 2010 (VanderWaal and Deen, 2018). Oggi, nei moderni sistemi di produzione, i problemi sanitari sono spesso dovuti a malattie multifattoriali e condizionate, in cui in un organismo di per sé fisiologicamente sotto *stress*, l'infezione da parte di agenti virali e batterici tipicamente a bassa patogenicità esita in malattia conclamata in presenza di co-fattori stressanti ambientali e manageriali (Amadori and Zanotti, 2016; Niewold et al., 2000). Ciò avviene nel caso dell'infezione da parte di importanti patogeni enterici, respiratori e sistemici oggi considerati endemici nell'allevamento intensivo del suino, come il virus della PRRS (PRRSV), il PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, il virus dell'influenza A del suino (SIV), ceppi patogeni di *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* spp., *Streptococcus* spp. (Maes et al., 2020). Per tutti questi casi, non è tanto importante rilevare la prevalenza di infezione in allevamento quanto considerare che la natura della malattia che ne deriva dipende da condizioni legate alla produzione e all'interazione tra patogeni, ed è influenzata da condizioni ambientali, manageriali e nutrizionali (Maes et al., 2020). Ecco che l'approccio alla diagnosi, prevenzione e controllo delle malattie necessariamente comporta una visione trasversale del problema e comprende

l'identificazione dei punti critici su cui intervenire per abbassare il livello di rischio.

Malattie epidemiche come le pesti suine (classica ed africana), le malattie vescicolari, il morbo di Aujeszky, caratterizzate da elevata morbilità e mortalità, rappresentano un rischio di sanità animale costante per le popolazioni suscettibili di suino domestico, con potenziali gravi conseguenze e ripercussioni di tipo sociosanitario. Il Regolamento (UE) 2016/429<sup>3</sup> in materia di sanità animale (*Animal Health Law*), stabilisce le norme per la prevenzione ed il controllo delle malattie trasmissibili degli animali, tese a garantire *“una migliore sanità animale a sostegno di una produzione agricola e un'acquacoltura sostenibili nell'Unione; il funzionamento efficace del mercato interno; una riduzione degli effetti negativi sulla sanità animale, sulla sanità pubblica e sull'ambiente: di alcune malattie e delle misure adottate per prevenire e lottare contro le malattie”*. Secondo la normativa europea, responsabili per la sanità animale e nell'esercizio delle loro attività, i veterinari adottano le misure necessarie a prevenire introduzione, sviluppo e diffusione delle malattie e garantiscono l'individuazione delle stesse attraverso una diagnosi corretta associata ad una lista di diagnosi differenziali, svolgendo un ruolo attivo nell'individuazione precoce e nella rapida risposta alle malattie.

Nella moderna suinicoltura, individuare l'agente causale di una malattia non è così semplice e non può basarsi esclusivamente sul risultato di un singolo test diagnostico, ancorché la maggior parte degli agenti patogeni sono ubiquitari e facenti parte del normale microbiota del suino: pertanto l'identificazione di un agente infettivo suggerisce solo una possibile diagnosi (Arruda and Gauger, 2019). L'accuratezza nello stabilire il nesso di causalità deriva dunque dalla corretta interpretazione di tutte le evidenze disponibili e risulta dalla deduzione di una diagnosi sulla base della sintesi

---

<sup>3</sup> <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32016R0429>. Consultato il 23/10/2022.

tra fattori di rischio individuati e causa prossima, rappresentata dall'agente infettivo o dall'insulto specifico associato alla lesione e allo stato patologico in atto (Burrough et al., 2019).

Partendo dalla conoscenza dell'ecologia e della biologia dei patogeni, nel determinare la causa di malattia bisogna tenere conto delle lesioni macroscopiche e istologiche, della differenziazione di virus e batteri sulla base dei fattori di virulenza, nonché del comparto anatomico da cui viene isolato il microrganismo. Ad esempio, nel suino le vie aeree superiori sono colonizzate da un microbiota complesso e la semplice identificazione o isolamento di *Haemophilus parasuis* (*Glasserella parasuis*) o *Streptococcus suis* tramite *polymerase chain reaction* (PCR) o coltura di *routine*, rispettivamente da cavità nasali e nasofaringee, non conferma la loro rilevanza clinica, né suggerisce che siano coinvolti nella malattia; se il proposito è quello di riconoscere *G. parasuis* come agente causale di poliserosite o meningite, la coltura dovrebbe essere isolata perlomeno da un essudato fibrinoso a livello di cavità celomatiche o da encefalo (Arruda and Gauger, 2019).

Per lo stesso principio, l'approccio diagnostico *in situ* alle malattie infettive del suino tramite l'impiego di metodiche istopatologiche garantisce di oggettivare il ruolo di un agente individuato, permettendo di associare i diversi patogeni alle lesioni microscopiche caratteristiche. Oltre a fornire evidenza di un *pattern* infiammatorio indicativo di uno specifico patogeno, l'istopatologia può facilitare la diagnosi in caso di infezione da patogeni difficili da coltivare in vitro (es. *Lawsonia intracellularis* nell'enteropatia proliferativa suina) (Driemeier et al., 2002; Guedes et al., 2002), poiché può servirsi di colorazioni istochimiche non specifiche, come la colorazione Ziehl-Neelsen per i batteri acido-resistenti come

*Mycobacteria* spp. e *Nocardia* spp., o colorazione *Gram* per altri batteri (Gupta et al., 2009; Woods and Walker, 1996). Infine, l'istopatologia dispone di tecniche ad alta specificità come l'immunoistochimica (IHC) o l'ibridazione in situ (ISH), in grado di mettere in evidenza direttamente nel tessuto e nel contesto della lesione rispettivamente l'antigene o l'acido nucleico di un agente infettivo (Hofman et al., 2017; Gupta et al., 2009). Nelle malattie infettive, la colorazione immunoistochimica aumenta la sensibilità della diagnosi consentendo la rilevazione di antigeni correlati ad uno specifico patogeno in associazione con le lesioni caratteristiche, e questo consente di stabilire il nesso causale tra patogeni e malattia (Haines and West, 2005). Nella diagnostica di *routine*, un valido esempio dell'applicazione dell'approccio diagnostico con obiettivo di co-localizzazione agente/lesioni è quello alla base delle diagnosi di *Porcine circovirus associated diseases* (PCVDs) associate all'infezione da PCV2, in cui l'istopatologia è la metodica discriminante per la diagnosi, considerata *gold standard* diagnostico (Segalés, 2012).

Storicamente, istologia ed immunoistochimica, permettendo di studiare la distribuzione dei patogeni nell'organismo e nei tessuti, si sono configurate come utili metodiche negli studi di patogenesi delle malattie, sia in campo che in prove sperimentali (Haines and West, 2005), nonché utili mezzi per lo studio di nuovi patogeni come nel caso della sindrome da deperimento progressivo post-svezzamento da PCV2 registrata negli anni '90 (Ellis et al., 1998; West et al., 1999). L'istopatologia è anche un supporto nello studio e nella caratterizzazione della patogenicità di nuove varianti virali e della loro variazione di tropismo e adattamento cellulare (Kedkovid et al., 2018; Kim et al., 2018; Zhang et al., 2017). Infine, ma non di minor importanza, l'istopatologia ha trovato applicazione anche negli studi di valutazione dell'efficacia dei vaccini, sia in studi di campo che in indagini sperimentali,

con l'obiettivo di rilevare residui virali nei tessuti dopo infezioni naturali o sperimentali successive al *challenge* vaccinale (es. PRRSV, PCV2, *M. hyopneumoniae*) (Bai et al., 2016; Evenson et al., 2016; Guarneri et al., 2021; Han et al., 2020; Oliver-Ferrando et al., 2018; Opriessnig et al., 2019; Park et al., 2014a; Yaeger, 2002). Dallo sviluppo e validazione delle procedure IHC e ISH per rilevare PRRSV, PCV2 e SIV nei tessuti (Halbur et al., 1994; Kim et al., 2009; Ruiz, 2017; Vincent et al., 1997), questi metodi sono stati ampiamente impiegati per studiare il ruolo di tali patogeni nelle malattie respiratorie dei suini all'ingrasso (Grau-Roma and Segalés, 2007; Hansen et al., 2010b, 2010a; Trang et al., 2014), così come nella riproduzione sperimentale delle malattie e nei modelli di co-infezione (Ober et al., 2017; Opriessnig et al., 2004; Park et al., 2014b; Ramamoorthy et al., 2011).

La sensibilità delle tecniche istopatologiche (IHC e ISH) per rilevare la presenza di un patogeno è inferiore rispetto ad altri test *in vitro* (PCR) pertanto, dipendentemente dalla quantità, la presenza di agenti patogeni nei tessuti non è sempre identificabile nelle sezioni istologiche. Oltre alla quantità di microrganismi presenti, nella valutazione istologica dei patogeni devono essere presi in considerazione altri due limiti principali: 1) persistenza del patogeno: ad esempio, in caso di SIV, i campioni possono essere negativi a partire da 72 ore dopo l'infezione (Caswell and Williams, 2015), per cui le sezioni di polmone risultano spesso negative alla presenza di SIV; 2) la disponibilità e specificità dei reagenti primari (anticorpi e sonde) per i patogeni studiati e la loro capacità di reazione in tessuti fissati in formalina. Se la microbiologia svolge un ruolo cruciale nella diagnosi delle infezioni, con la possibilità di identificazione degli agenti infettivi e nella determinazione della sensibilità dei patogeni alla terapia

farmacologica, la patologia, tuttavia, è l'unico modo per correlare la presenza di un agente infettivo con la reazione fisiopatologica che esso evoca a livello cellulare e tissutale (Hofman et al., 2017): in base alla disponibilità di anticorpi o sonde per oggettivare la presenza di virus o batteri nelle sezioni istologiche, la patologia si configura come metodica diagnostica utile per identificare i patogeni causali.

In conclusione, l'anatomia patologica, integrata alle informazioni sulla storia clinica, ai dati epidemiologici e ai risultati di altri test diagnostici diretti ed indiretti, grazie allo studio macroscopico e alla caratterizzazione istologica delle lesioni, svolge un ruolo fondamentale nella determinazione della causalità di malattia nella diagnosi delle malattie infettive. La possibilità di co-localizzazione di un agente all'interno delle lesioni che produce è l'obiettivo principale, già applicato in alcune malattie (infezioni da PCV2, PRRSV, *L. intracellularis*) e da raggiungere per altre condizioni patologiche nel prossimo futuro. L'utilità della patologia sistematica nello studio delle malattie da agenti infettivi non può prescindere dalla conoscenza della biologia e dell'ecologia dei patogeni, nonché della patogenesi delle diverse malattie, informazioni necessarie per la scelta della collezione dei campioni appropriati ai fini del riconoscimento delle lesioni e della rilevazione dei patogeni nei tessuti *target*.

## **1.2 L'esame necroscopico ed il campionamento mirato alla diagnosi istopatologica**

Nel contesto dell'allevamento intensivo l'attività diagnostica dovrebbe essere approcciata secondo i principi della medicina di popolazione, in cui i risultati diagnostici ottenuti su di un gruppo di animali sono trasferiti per inferenza ai fini di implementare la salute di tutto il gruppo. I criteri per la scelta degli individui più

appropriati da comprendere nel campionamento ed il tipo di campioni da prelevare sono dettati dal principale quesito diagnostico formulato. Per ottimizzare la selezione del campione è necessario considerare che la probabilità di rilevamento o isolamento dell'agente patogeno è direttamente influenzata dallo stadio del processo patologico (acuto, subacuto o cronico) e dalla sua fisiopatologia. Una chiara comprensione dei segni clinici, della distribuzione delle lesioni e dei tassi di trasmissione dei patogeni offre l'opportunità di identificare i singoli suini che possono trovarsi in diverse fasi del processo patologico. Ciò consente di raccogliere diversi tipi di campioni all'interno della popolazione. La scelta degli animali da includere nel campione dipende dall'obiettivo presupposto: se l'obiettivo è rilevare l'agente, l'antigene o il materiale genetico, il primo passo ai fini del campionamento è individuare suini in stato febbrile e gravemente colpiti dalla malattia. La selezione di suini che non abbiano ancora ricevuto il trattamento antibiotico è essenziale se il fine diagnostico è l'isolamento batterico. Al contrario, se l'obiettivo è dimostrare la conversione anticorpale, è più probabile che abbia successo la selezione di suini che abbiano superato lo stadio febbrile della malattia. Sebbene la selezione di animali affetti da malattie croniche possa comportare l'osservazione di un ampio spettro di lesioni macroscopiche e istologiche, questi risultati diagnostici spesso non sono rappresentativi del problema della mandria e pertanto dovrebbero essere evitati nel contesto della medicina di popolazione (Arruda and Gauger, 2019).

Una corretta indagine diagnostica necessariamente inizia con una o più domande ben definite ed obiettivi specifici. La raccolta obiettiva di informazioni anamnestiche e cliniche guida verso la formulazione di un preciso quesito

diagnostico. Tutti gli aspetti successivi dell'indagine, compresa la selezione e il campionamento degli animali, il numero di campioni richiesti e la selezione di particolari test diagnostici, dipendono dal contesto clinico e dalle domande specifiche sollevate. L'esame necroscopico sistematico permette di individuare le lesioni macroscopiche principali che nella maggior parte dei casi, anche quando non patognomoniche, consentono di stilare una lista di diagnosi differenziali (Arruda and Gauger, 2019).

L'esame *post-mortem* è il primo passo di un'indagine che va oltre la “dissezione e l'esame microscopico dei tessuti” permettendo il campionamento ai fini di una vasta gamma di test e metodiche utili alla rilevazione degli agenti patogeni (Dada and Ansari, 1996). La collezione dei campioni di tessuto da esaminare può basarsi sul prelievo delle principali lesioni macroscopiche osservate, comprendendo sempre anche porzioni di tessuto macroscopicamente morfologicamente normale; oppure sulla scelta di prelevare campioni multipli sulla base del quesito diagnostico. Quest'ultimo approccio è particolarmente utile considerando che nel moderno sistema d'allevamento intensivo del suino molte malattie sono di tipo subclinico: in assenza di sintomatologia e lesioni apparenti, l'infezione di un dato patogeno comporta ugualmente perdite di *performance* produttive in termini di incremento ponderale giornaliero e resa al macello (Ramirez and Karriker, 2019). È il caso dell'infezione da PCV2, dove grazie alla vaccinazione le forme conclamate di malattia si sono ridotte a favore della forma subclinica di infezione (PCV2-SI); le PCVDs sono il chiaro esempio di malattie i cui criteri diagnostici si basano sulla diagnostica patologica *in situ*, includendo l'osservazione delle lesioni caratteristiche nei tessuti *target* (prevalentemente tessuti linfoidi) e la rilevazione dell'antigene mediante IHC o ISH nel contesto delle lesioni (Segalés, 2012; Segalés and Sibila, 2022). Pertanto, se

si sospetta una forma subclinica di infezione da circovirus, ai fini della diagnosi di PCV2-SI, sulla base del sospetto, dovranno necessariamente essere campionati i tessuti linfoidei per rilevare la presenza dell'antigene di PCV2, in associazione o meno alle lesioni istologiche caratteristiche (deplezione linfoide) di natura lieve (Segalés and Sibila, 2022).

Il protocollo *standard* per l'esame necroscopico include un elenco di tessuti/organi da fissare in formalina che varia a seconda della specie, del sesso e di altri fattori; negli animali da reddito, in corso di esame *post-mortem* eseguito con approccio orientato al problema fondato sul quesito diagnostico, può comprendere l'elenco di tessuti *target* individuati sulla base delle diagnosi differenziali (Maxie and Miller, 2016). L'esame istopatologico ai fini della diagnostica patologica *in situ* delle malattie infettive nel suino permette di esaminare più tessuti *target* per confermare il ruolo degli agenti sospetti causali di malattia o a suggerire concause o *noxae* alternative. In linea generale, il campionamento dei tessuti per l'istopatologia in corso di esame necroscopico prevede il prelievo di porzioni di tessuto di pochi cm di spessore (1-2 cm) da fissare in formalina tamponata al 10%, che comprendano la lesione e possibilmente parte del tessuto adiacente morfologicamente normale. A seconda dei diversi organi e apparati, è opportuno comprendere nel campionamento le diverse strutture anatomiche e funzionali presenti (es. porzione corticale e midollare del rene; vie aeree contestualmente al parenchima polmonare). È raccomandato il prelievo di più porzioni di polmone comprendenti entrambe le componenti cranio-ventrale e caudale del parenchima polmonare; nell'intestino, considerando la distribuzione spesso

segmentale delle lesioni, campionare più segmenti dei diversi tratti di piccolo e grosso intestino (Arruda and Gauger, 2019).

### *1.2.1 Tecnica necroscopica di base*

Nelle fasi iniziali dell'esame necroscopico è opportuno procedere con l'esame esterno della cute, dell'ombelico, delle estremità, delle articolazioni, della cavità orale, delle vie respiratorie superiori e del perineo.

L'esame delle regioni cutanee è utile per osservare variazioni nel colore, la presenza di erosioni, croste, papule, pustole, aree alopeciche. Le lesioni cutanee possono essere primarie, quindi riferibili a malattie primarie di cute e annessi, oppure di tipo secondario ed essere dunque la manifestazione di malattie sistemiche, come nel caso delle caratteristiche lesioni romboidali necrotico-emorragiche nel Mal Rossino da *Erysipelothrix rhusiopathiae*, o dei focolai multifocali di necrosi dell'epidermide espressione di vasculite nella *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome* (PDNS) (Torrison and Cameron, 2019). Con un accurato esame esterno sono quindi raccolte informazioni utili alla formulazione delle diagnosi differenziali e ad indirizzare nel campionamento dei tessuti: nei casi acuti di PDNS oltre alla vasculite necrotizzante di piccoli e medi vasi ematici, con il campionamento del rene, microscopicamente sarà possibile osservare una glomerulonefrite essudativa extracapillare oppure glomerulosclerosi e tubulonefrite interstiziale associata a fibrosi nei casi cronici (Drolet et al., 1999).

In corso di ispezione esterna della carcassa si esegue anche l'esame degli unghia e degli spazi interdigitali, nonché l'esame particolare delle articolazioni, di cui si valuta la mobilità e le modifiche nel volume e della forma. È inoltre opportuno notare la presenza di anomalie nel cavo orale, la presenza di secrezioni oculari, nasali

e a livello di aperture naturali nonché la presenza di traumi/fratture ed ernie (Arruda and Gauger, 2019; De las Heras Guillamòn and García de Jalón, 2004).

Dopo l'esame esterno si procede allo scuoiamento in decubito dorsale (Figura 1), procurando un'incisione sagittale a partire dalla sinfisi mentoniera lungo la linea alba fino alla zona dell'ano, cui segue l'esame del tessuto connettivo sottocutaneo e dell'apparato locomotore. Vengono esaminati: i linfonodi sottocutanei di cui viene valutata la dimensione, la forma e l'aspetto; le alterazioni muscolari; le aree periarticolari (De las Heras Guillamòn and García de Jalón, 2004).

A livello articolare possono essere osservati gli esiti di malattie infiammatorie (es. artriti infettive) o degenerative. Qualora ve ne sia l'indicazione, è preferibile campionare le articolazioni prima di prelevare campioni di tessuto toracico o addominale per evitare la contaminazione dei campioni articolari; il liquido articolare può anche essere aspirato con un ago e una siringa una volta riflessa la pelle o per via percutanea. Il liquido articolare può essere sottoposto a coltura, test molecolari (PCR) ed altri test di patologia clinica. Per l'esame delle articolazioni si esegue l'asportazione dei tessuti molli adiacenti per esaminare legamenti e terminazioni tendinee. Con l'incisione della capsula articolare si possono dunque apprezzare: l'aspetto del liquido articolare, anomalie delle superfici articolari (es. malformazioni, deformazioni), lo stato dei legamenti (Petterino et al., 2003a).

Nella maggior parte dei casi, le artriti sono una possibile manifestazione di infezioni sistemiche. Nel suino, le cause più comuni di artriti infettive comprendono una lunga lista di agenti eziologici batterici tra cui: *Actinobacillus suis*, *Brucella suis*, *E. rhusiopathiae*, *E.coli*, *H. parasuis* (*G. parasuis*),

*Mycoplasma* spp. *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *S. suis*. Nel suino, *S. suis* è isolato dalle vie aeree superiori dell'80% di suini clinicamente sani ma sporadicamente, soprattutto il sierotipo 2, si rende responsabile di sindromi setticemiche che si manifestano con meningiti purulente, poliartriti e polisierositi fibrinopurulente, broncopolmoniti ed endocarditi. Come per *H. parasuis* (*G. parasuis*) agente causale della *Glasser's disease* del suino caratterizzata da meningite fibrinosa, polisierosite e poliartrite sierofibrinosa, e che produce lesioni simili a *S. suis*, in questi casi le sindromi sono definite su base eziologica tramite isolamento dei patogeni dai visceri/fluidi articolari (Craig et al., 2016).



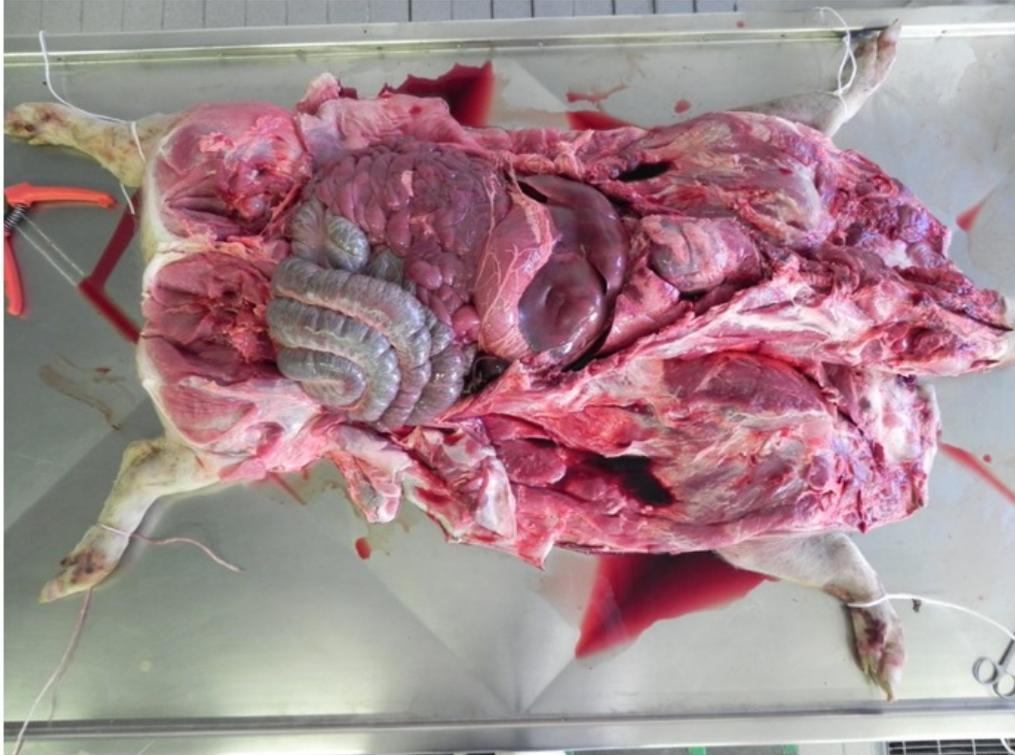
Figura 1. Tecnica necroscopica: step successivi della procedura necroscopica, dal decubito dorsale, incisione lungo la linea alba, scollamento di cute e sottocute ed esame del sottocute (Foto per Gentile Concessione di: Prof. Giuseppe Sarli).

Dopo lo scuoiamento, una possibilità è quella di provvedere all'apertura della cavità addominale seguita dall'apertura di quella toracica con cavità addominale

aperta e non eviscerata. Partendo dal margine posteriore della cartilagine xifoidea dello sterno si incide con un bisturi la parete addominale procurando un'incisione del peritoneo e creandosi un occhiello dal quale si prosegue l'incisione fino alla regione inguinale (Figura 2). L'esposizione dei visceri consente di valutarne la topografia, di esaminare l'aspetto generale delle sierose e di rilevare la presenza di versamenti in cavità (Petterino et al., 2003b). Per l'apertura della gabbia toracica, dopo aver eliminato i tessuti molli circostanti, inserendo un costotomo a livello di ingresso del torace, si procede bilateralmente al taglio delle costole all'altezza delle giunzioni costocondrali, procedendo in direzione caudale fino all'ultima costola e terminando con la recisione della cupola diaframmatica. A questo punto è possibile valutare contemporaneamente ambo le cavità, toracica e addominale, nei rapporti tra organi intracavitari (Petterino et al., 2003c) (Figura 3).



*Figura 2. Tecnica necroscopica: apertura della cavità addominale (Foto per Gentile Concessione di: Prof. Giuseppe Sarli).*



*Figura 3. Tecnica necroscopica: esposizione contemporanea delle cavità toracica ed addominale (Foto per Gentile Concessione di: Prof. Giuseppe Sarli).*

Per l'apertura della testa, dopo la dissezione dei tessuti molli circostanti, si opera la disarticolazione dell'articolazione atlanto-occipitale; segue la rimozione di cute e tessuti molli della testa per esporre le ossa craniche. La volta cranica viene rimossa segnando l'osso a livello di incisive pretracciate, facendo un cerchio di tagli attraverso il cranio: dal condilo occipitale alla base dell'orecchio, dalla base dell'orecchio fino all'orbita oculare, da qui fino all'orbita controlaterale, di nuovo alla base dell'altro orecchio, e infine di nuovo al condilo occipitale; il tutto evitando il contatto con il tessuto cerebrale sottostante. Segue il sollevamento della base ossea con l'aiuto di martello e scalpello. Quindi incidere e rimuovere la dura madre, la falce e il tentorio utilizzando pinze e forbici o un bisturi.

A questo punto la testa viene capovolta, leggermente inclinata da un lato e scossa delicatamente per estrarre il cervello dal cranio ed esporre i nervi cranici; i nervi cranici devono essere tagliati trasversalmente sul lato esposto il più vicino

possibile ai loro forami di uscita; l'operazione viene ripetuta per il lato controlaterale. Tenendo la testa sottosopra, si procede al taglio dei restanti nervi cranici compreso il nervo ottico e qualsiasi altra adesione meningea; quindi agitare delicatamente per estrarre completamente l'encefalo. Immediatamente dopo la rimozione dell'encefalo, si effettua l'esame della volta cranica, delle meningi, dell'ipofisi, dei nervi cranici e dei loro forami per rilevare eventuali anomalie. L'encefalo viene dunque esaminato alla ricerca di lesioni macroscopiche esterne dopo la rimozione e prima della fissazione (Vandeveldet et al., 2012). Dopo l'apertura della testa, è possibile eseguire l'esame delle cavità nasali procurando tagli seriali trasversali a partire dal dorso delle ossa nasali fino al taglio a tutto spessore dell'osso mascellare (Figura 4).



*Figura 4. Tecnica necroscopica: apertura delle cavità nasali. Dopo l'apertura della testa per il campionamento dell'encefalo, si può procedere alla ispezione delle cavità nasali per il controllo della rinite atrofica, operando un taglio trasversale all'altezza dei premolari (Foto per Gentile Concessione di: Prof. Giuseppe Sarli).*

### **1.3 Approccio orientato al problema: le patologie respiratorie del suino**

L'esame *post-mortem* orientato al problema è focalizzato su organi e tessuti di interesse esaminati e raccolti ai fini dell'esame istopatologico e delle indagini diagnostiche collaterali.

L'esame e il campionamento degli organi toracici comportano la rimozione della lingua, faringe, laringe, della trachea e dei polmoni. L'asportazione parte dall'eseguire due incisioni bilateralmente lungo e medialmente alle branche mandibolari, dall'angolo della mandibola procedendo rostralmente verso la sinfisi mentoniera. Il taglio deve essere a tutto spessore e riguardare i tessuti molli (cute, piano muscolare e mucosa) del pavimento della cavità orale. Successivamente la lingua viene estratta da una delle due brecce di discontinuità create, si discontinuano i tessuti molli a livello di sinfisi mentoniera in modo da sollevare il pavimento ventrale della cavità orale fino all'esposizione delle tonsille del palato molle. In questa fase le tonsille possono essere mantenute in sede o asportate bilateralmente (Figura 5). Una volta discontinuati i tessuti molli del rinofaringe e gli apparecchi di sospensione dello ioide, la trachea e l'esofago sono ulteriormente esposti tirando la lingua e la laringe caudalmente insieme ad una combinazione di dissezione smussa e rifilatura con coltello fino all'ingresso del torace. A questo punto si può procedere mediante trazione caudale con l'estrazione, in un'unica soluzione, delle porzioni intracavitare di trachea, esofago, mediastino (compreso il timo, se presente), polmoni e cuore (Petterino et al., 2003c).

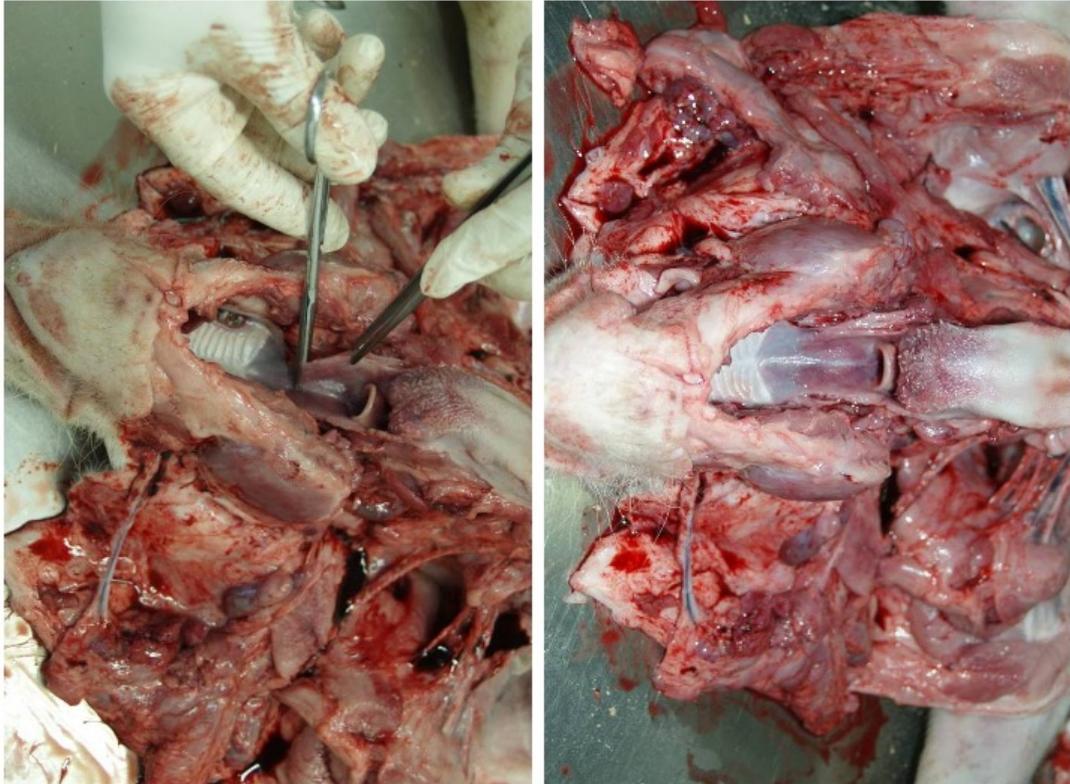


Figura 5. Tecnica necroscopica: prelievo delle tonsille patatine (Foto per Gentile Concessione di: Prof. Giuseppe Sarli).

I linfonodi mediastinici, sottomandibolari e tracheobronchiali dovrebbero essere esaminati e campionati se ingrossati o emorragici.

Quando le lesioni appaiono simili in diversi lobi polmonari, ai fini dell'esame istologico, può essere sufficiente il prelievo di 1–2 campioni. Tuttavia, se ci sono aree che differiscono per consistenza, colore o aspetto, dovrebbe essere campionata ogni singola lesione. I campioni da prelevare per le indagini devono sempre includere la pleura e almeno una sezione delle vie aeree maggiori, specialmente quando si sospetta infezione da SIV o da *M. hyopneumoniae*. Le lesioni polmonari nei suini sono spesso più gravi nei lobi cranioventrali. Se la variazione del colore può essere un indicatore ingannevole di polmonite, soprattutto con congestione ipostatica o modesta autolisi, la struttura e consistenza polmonare è invece un indicatore più affidabile di malattie

polmonari, potendo rilevare aree di consistenza soda, gommose, congestionate o non collassate di particolare interesse. Se, viceversa, non si osservano lesioni macroscopiche, può essere appropriato prelevare un campione casuale di cinque sezioni di polmone dai diversi lobi polmonari, comprendendo componenti cranio-ventrale e dorso-caudale del parenchima per un'approfondita valutazione istologica del polmone.

Il cuore viene esaminato incidendo prima il pericardio. A questo punto può essere raccolto in una siringa il liquido pericardico se anormale o presente in eccesso. Gli essudati fibrinosi possono essere campionati con l'esecuzione di tamponi. La superficie del cuore viene esaminata per raccogliere evidenze di infiammazione o emorragia. Si procede alla dissezione del cuore incidendo entrambi i ventricoli ed il setto per esaminare le valvole cardiache ed il miocardio. Se indicato dall'esame clinico o patologico, raccogliere sezioni di eventuali lesioni, nonché setto, muscolo papillare e ventricoli destro e sinistro per la fissazione (Arruda and Gauger, 2019).

### *1.3.1 Pattern macroscopici di polmonite*

L'esame macroscopico degli organi isolati è condotto partendo dall'identificazione e descrizione delle lesioni osservate, seguite da una fase di sintesi e interpretazione del processo patologico, espressa nella formulazione di una diagnosi morfologica. Nella patologia respiratoria del suino o Complesso delle Malattie Respiratorie del suino (PRDC), i *pattern* macroscopici di distribuzione delle lesioni polmonari, per la loro stretta correlazione con le patogenesi di malattia, forniscono delle indicazioni precise sui potenziali patogeni coinvolti, risultando una guida nell'interpretazione dei processi patologici in atto.

Nel suino, i patogeni responsabili di malattia respiratoria possono raggiungere il polmone, bersaglio di lesione, per vie aerogena o ematogena sviluppando rispettivamente *pattern* differenti di distribuzione delle lesioni. Il *pattern* di lesione macroscopica osservato in caso di infezione per via aerogena è rappresentato dal coinvolgimento delle porzioni cranioventrali del polmone, come in caso di polmonite enzootica del suino e in corso di broncopolmonite. Gli agenti eziologici di queste polmoniti cranio-ventrali del suino sono virus respiratori (es. virus della pseudorabbia - PRV, SIV) e *M. hyopneumoniae*, spesso associati ad infezioni batteriche secondarie concomitanti. Le caratteristiche macroscopiche tipiche delle polmoniti aerogene, riassunte nella Figura 6, includono:

1. variazione di consistenza con consolidamento del parenchima polmonare (dall'epatizzazione in fase acuta alla carnificazione in caso di cronicizzazione);
2. variazione di colore: dal rosso scuro nelle aree epatizzate, al biancastro nelle lesioni croniche. La variazione cromatica può essere accentuata anche dall'edema infiammatorio (fase acuta) del tessuto connettivo perilobulare e dal suo ispessimento fibroso (fase cronica);
3. presenza di essudato nelle vie aeree, da scarso e denso essudato catarrale (polmonite enzootica (EP), causata da *M. hyopneumoniae*) a raccolta di pus nei casi di EP complicata e nelle broncopolmoniti;
4. ispessimento murale biancastro ("*cuffing pneumonia*") delle piccole vie aeree presenti in corso di EP.

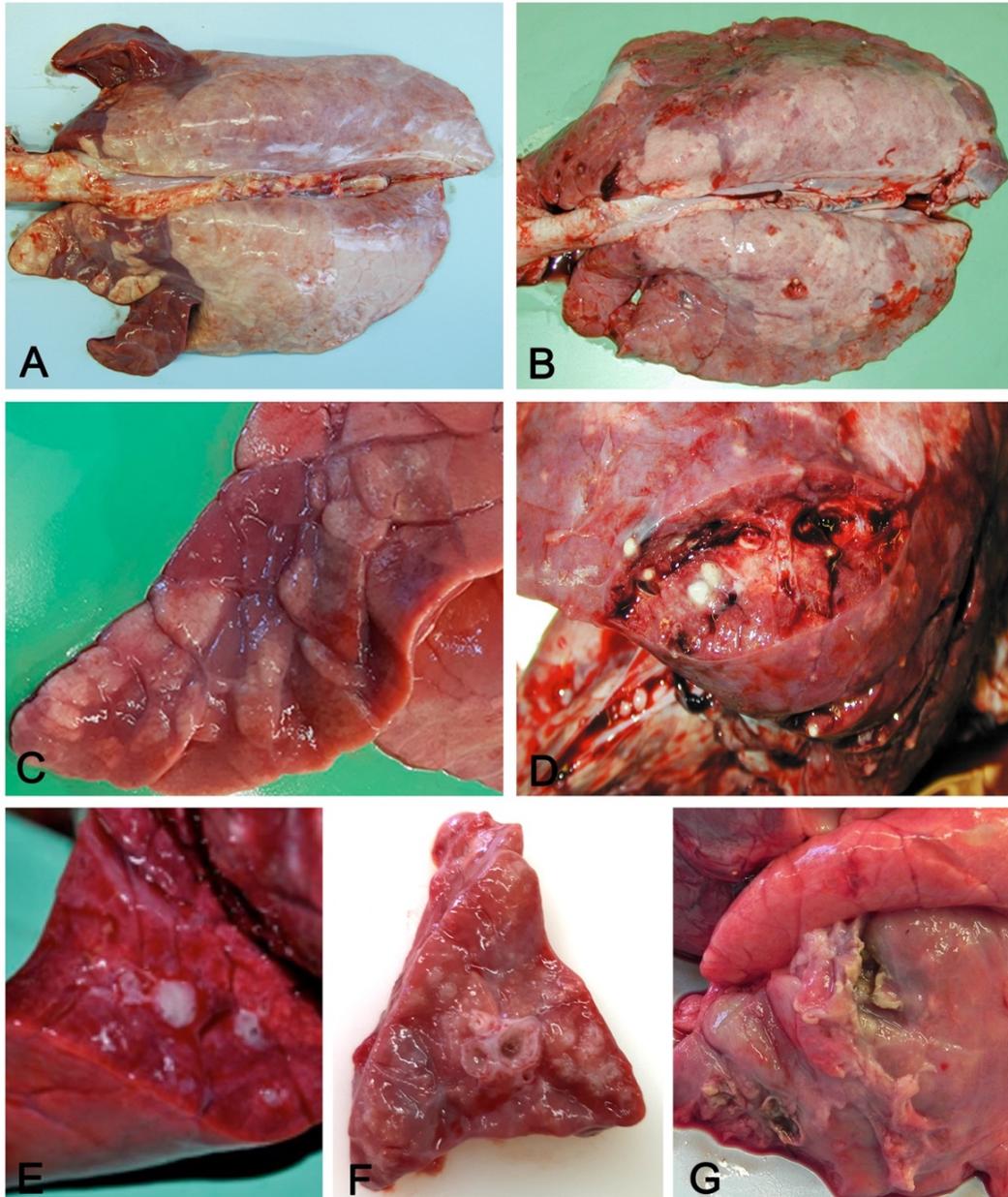


Figura 6. Polmonite aerogena. Distribuzione cranioventrale delle lesioni, caratterizzate da: (A) lobuli rosso scuro, coalescenti, depressi (C) con consolidamento e muco nelle vie aeree (E); tutte caratteristiche indicative di polmonite enzootica, in una polmonite aerogena acuta e moderata, non complicata. Consolidamento del parenchima polmonare con distribuzione cranioventrale (B) con focolai multifocali di suppurazione (D) con necrosi pleurica e fibrosi (G), caratteristiche tipiche di polmonite enzootica o broncopolmonite complicate da infezioni secondarie. In (F), "cuffing" delle vie aeree, reperto solitamente presente in corso di polmonite enzootica ma osservato anche in polmoniti complicate (Sarli et al., 2021).

Altri reperti macroscopici sono la distribuzione lobulare e lobare delle lesioni nei lobi polmonari coinvolti. La distribuzione lobulare coinvolge lobuli singoli o più lobuli (secondari) polmonari con coalescenza delle lesioni nelle porzioni cranioventrali del polmone che appaiono di colore rosso scuro e di consistenza compatta, entrambe

caratteristiche tipiche delle lesioni incipienti acute nella polmonite enzootica e nella broncopolmonite. La distribuzione lobare interessa un intero lobo in corso di lesione acuta (un esempio è la polmonite fibrinonecrotizzante causata da *A. pleuropneumoniae*) o di lesione cronica (coinvolgimento progressivo dell'intero lobo nell'EP complicata e nella broncopolmonite, con presenza di lesione lobulare acuta recente, mescolata a alterazioni fibrotiche o purulente croniche). Nella EP un reperto tipico è rappresentato dalle fissurazioni, ovvero l'approfondimento del parenchima dovuto ad alveoli collassati o ad ispessimento fibroso interlobulare (Caswell and Williams, 2015).

Ci sono alcune eccezioni a quanto sopra affermato: *A. pleuropneumoniae* raggiunge il polmone attraverso le vie aeree ma il loro coinvolgimento non è una caratteristica tipica, se non nelle forme complicate da altri batteri. Le lesioni non sono strettamente cranioventrali ma sono tipicamente localizzate nelle porzioni dorsali dei lobi polmonari caudali (Yaeger and Alstine, 2019) e sono di frequente riscontro sia la forma classica di polmonite lobare acuta fibrinosuppurativa, emorragica e necrotizzante con polmone epatizzato e pleurite fibrinosa, sia la forma cronica espressa da un'ampia area monolaterale o focolai multipli di fibrosi, necrosi e/o suppurazione (Figura 7).



Figura 7. Pleuropolmonite acuta (A) e cronica (B) da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In (A), dorsalmente, a livello di lobo polmonare sinistro, il parenchima polmonare presenta una lesione nodulare rilevata, ulcerata e con associata grave pleurite riferibile ad infezione da *A. pleuropneumoniae*. Contestualmente si osserva anche lieve polmonite cranioventrale. Nella forma cronica (B) si osservano noduli multipli (Sarli et al., 2021).

Un'altra eccezione è la polmonite causata da SIV: la patogenesi è aerogena ma la lesione è rappresentata da consolidamento con variazione del colore dei lobi craniali (Caswell and Williams, 2015) associato al consolidamento lobulare multifocale dei lobi caudali <sup>4</sup>.

La diffusione dei patogeni per via ematogena implica una diversa distribuzione delle lesioni. Se gli agenti eziologici entrano nel polmone attraverso questa via di ingresso, le lesioni possono distribuirsi nell'intero organo, ma sono localizzate principalmente nelle aree dorsali dei lobi caudali dove la vascolarizzazione è più prominente. Il coinvolgimento ematogeno del polmone può manifestarsi come:

- polmonite embolica (arresto nel polmone di tromboemboli settici originato da un'inflammatione localizzata altrove). Il carattere macroscopico di rilievo è la presenza di focolai di iperemia/emorragia in caso di lesioni recenti, o di ascessi in caso di lesioni croniche, in entrambi i casi con distribuzione multifocale

<sup>4</sup> <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/influenza>. Consultato il 28/11/2022.

casuale, principalmente nelle aree dorsali del polmone meglio vascolarizzate (Figura 8);

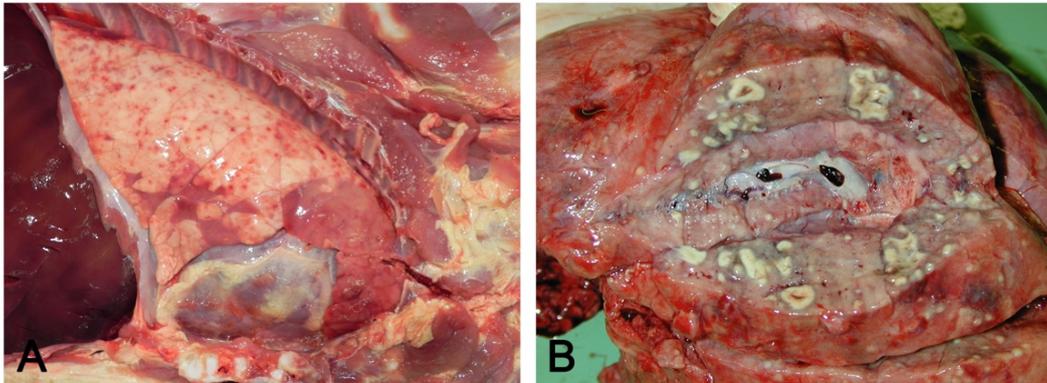


Figura 8. Polmonite embolica. In (A), il lobo basale destro è caratterizzato da lesioni acute multifocali rappresentate da focolai di iperemia/emorragia riferibili ad una batteriemia, spesso di origine intestinale. In (B), focolai multipli di suppurazione circondati da parenchima polmonare normale, dovuti all'arresto nel polmone di microtrombi originatisi in periferia da una flebite settica (Sarli et al., 2021).

- polmonite interstiziale (arrivo di agenti pneumotropi o endoteliotropi al polmone attraverso la circolazione sanguigna, come accade nelle infezioni da PRRSV e PCV2 e in corso di setticemia da batteri gram-negativi). L'aspetto macroscopico osservato è quello di una polmonite interstiziale caratterizzata da polmoni non collassati, con impronte costali e lesioni lobulari o diffuse a chiazze, con variazione di colore (che va dal rosso negli stadi acuti ad un colore biancastro pallido nelle forme croniche), cambiamento di consistenza (struttura solida), edema interstiziale (in fase acuta) e mancato coinvolgimento delle vie aeree (Figura 9).

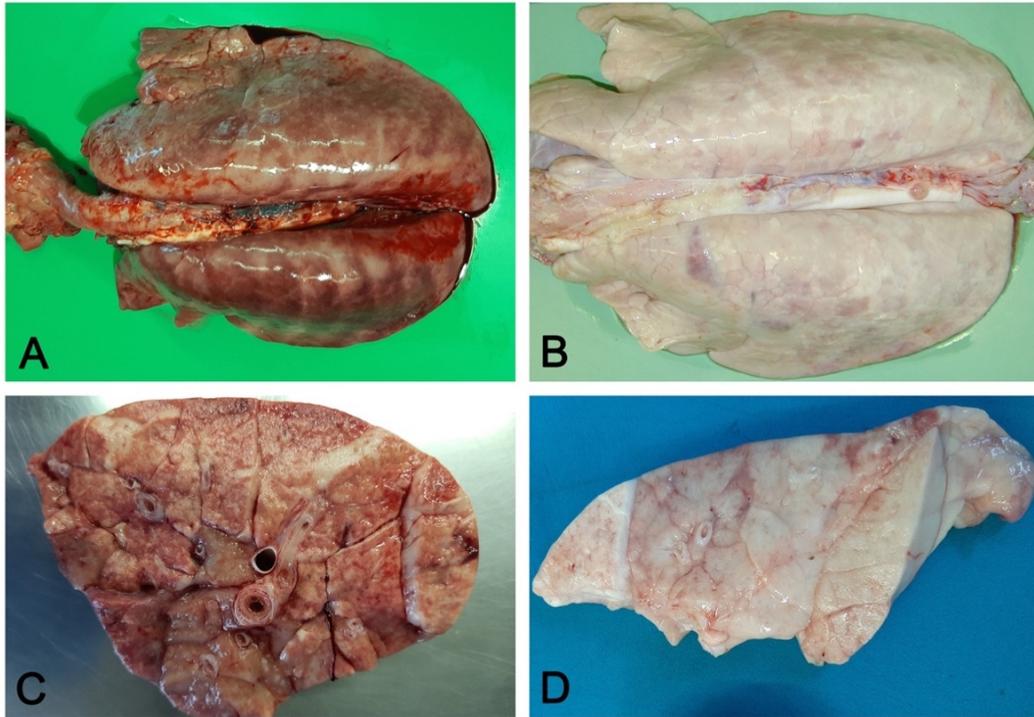


Figura 9. Polmonite interstiziale. Polmoni non collassati, con impressioni delle coste (A), nelle forme acuta (A) e cronica (B) di polmonite interstiziale. Lesioni acute includono iperemia ed edema diffusi del connettivo perilobulare (C). Nelle lesioni croniche il polmone è gravemente aumentato nella consistenza e chiaro a causa della fibrosi (D) (Sarli et al., 2021).

Esempi di forme ematogene di polmonite sono anche quelle dovute ad infestazione polmonare da *Metastrongylus* spp. e *Ascaris suum*, in cui la lesione polmonare (polmonite interstiziale) è dovuta al danno alveolo-settale causato delle larve e, solo per *Metastrongylus*, anche dagli adulti localizzati nei piccoli bronchi nelle zone dorsali del polmone, dove provocano bronchite catarrale-purulenta al cui sviluppo possono contribuire anche complicanze batteriche secondarie. Tuttavia, queste ultime sono lesioni complesse, rappresentate da polmonite interstiziale e polmonite granulomatosa diretta contro i parassiti. Sono inoltre spesso associate ad enfisema e ad atelettasia a seconda che la presenza di essudato e parassiti nelle piccole vie aeree provochi rispettivamente ostruzione o occlusione.

In entrambe le differenti vie di coinvolgimento polmonare sopra descritte, una possibile lesione associata può essere rappresentata da linfonodi mediastinici scuri

ed ingrossati. In corso di pseudorabbia, occasionalmente i suini possono presentare infiammazione dei turbinati nasali e della trachea, o necrosi delle tonsille e/o della mucosa tracheale (Janke, 1995). Nella diffusione ematogena di malattie sistemiche (PCV2 e PRRSV) sono colpiti da lesioni specifiche anche altri tessuti, principalmente organi linfoidei (Caswell and Williams, 2015).

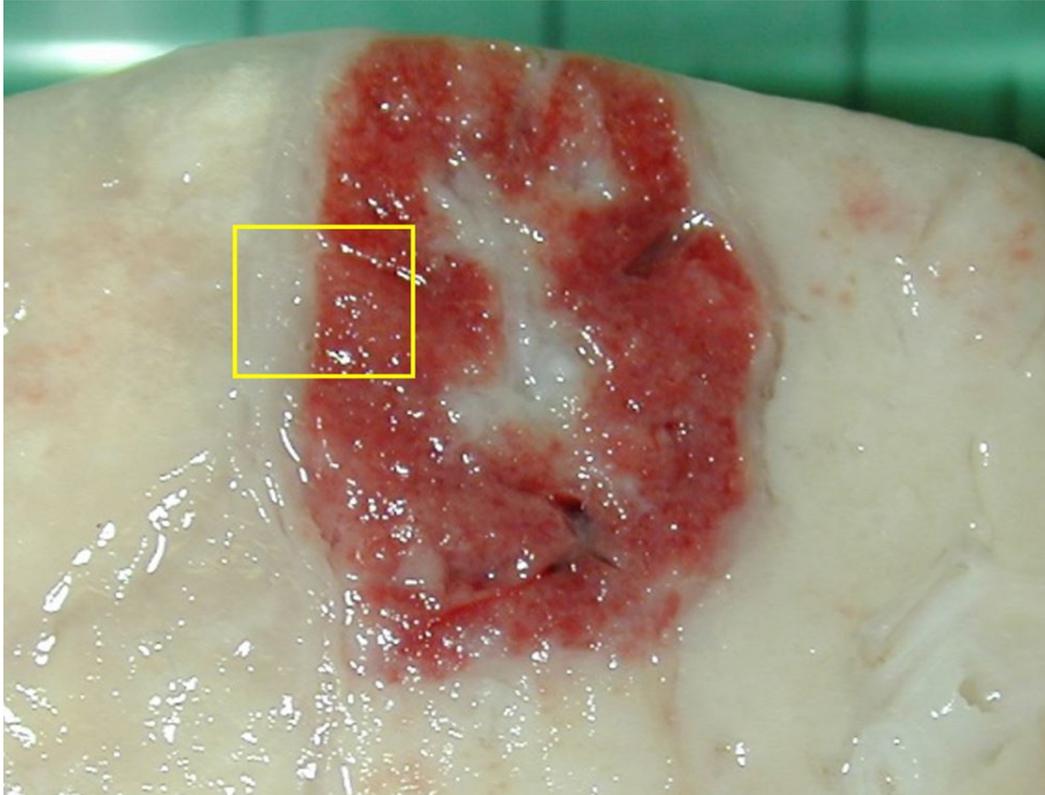
I tentativi di correlare i microrganismi identificati, che siano virus o batteri, con la lesione macroscopica del polmone, precedentemente classificata come broncopolmonite catarrale, broncopolmonite purulenta, polmonite interstiziale, broncopolmonite interstiziale, pleuropolmonite e pleurite hanno prodotto risultati significativi, ma un singolo agente è spesso correlato a più di un tipo di lesione (Ruggeri et al., 2020). Questo può essere dovuto alla presenza simultanea di diversi virus/batteri nell'eziopatogenesi della malattia (Ruggeri et al., 2020).

Sebbene il modello macroscopico del coinvolgimento polmonare per via aerea o ematogena sia diverso, le complicanze batteriche secondarie fanno sì che l'aspetto macroscopico sia spesso condiviso tra le due modalità di coinvolgimento polmonare. PRRSV e PCV2 che raggiungono il polmone per diffusione ematogena e SIV e *M. hyopneumoniae* che colonizzano il polmone per via aerogena sono considerati patogeni respiratori primari del suino a livello mondiale e, anche se la loro via di ingresso nel polmone è diversa, forme di EP con complicazioni batteriche e le forme di polmonite da PCV2, SIV o PRRSV complicate, condividono caratteristiche macroscopiche simili. L'istologia in questi casi può fornire ulteriori dettagli discriminanti. L'istologia e l'identificazione dell'agente sono necessarie anche nei casi di evidenza macroscopica di lesioni di EP, poiché l'aspetto macroscopico di polmonite aerogena cranioventrale

spesso può rappresentare una forma lieve e iniziale di polmonite causata da un agente diverso da *M. hyopneumoniae* (Caswell and Williams, 2015).

### 1.3.2 Istologia e co-localizzazione agente eziologico/lesioni

Le metodiche istopatologiche possono essere un importante supporto diagnostico per identificare i patogeni coinvolti nelle malattie. In una recente indagine (Ruggeri et al., 2020) PRRSV, *H. parasuis* (*G. parasuis*) e *Streptococcus* spp. e PRRSV, *P. multocida* e *Streptococcus* sono stati frequentemente identificati in assenza di lesioni macroscopiche nei polmoni di suinetti svezzati e nei suini da ingrasso, rispettivamente. Ciò rafforza l'importanza di associare l'identificazione di un patogeno alla lesione da esso causata. L'esame microscopico dei tessuti, in alcuni casi, consente l'osservazione delle alterazioni morfologiche caratteristiche indotte da uno specifico patogeno e la microscopia può essere un rapido saggio diagnostico (Gupta et al., 2009). Nella PRDC, l'istopatologia viene impiegata per confermare e valutare la diagnosi eziologica per diversi patogeni batterici e virali, sia in studi sul campo che in condizioni sperimentali. I campioni dovrebbero essere prelevati dalle lesioni più recenti e acute, dove è maggiore anche la probabilità di colocalizzare il patogeno responsabile con le rispettive lesioni caratteristiche. Per questo motivo è opportuno evitare il campionamento di aree centrali verosimilmente colpite da necrosi o con caratteristiche di cronicità della lesione, aspetti che potrebbero interferire con la valutazione morfologica e con la corretta interpretazione della lesione. La quantità maggiore di informazioni è ottenuta da campioni che includono la lesione e porzioni di tessuto normale circostante in cui la lesione acuta più recente è presente in posizione marginale (Figura 10).



*Figura 10. Il campionamento ai fini dell'esame istologico prevede che il prelievo avvenga ai margini della lesione evitando le porzioni più centrali, aree verosimilmente alterate da processi necrotici o in cui si osservano lesioni complicate. Il campionamento alle estremità della lesione (riquadro giallo), comprendendo porzioni di parenchima nella norma, permette di osservare le alterazioni morfologiche del processo patologico ai suoi esordi (a livello di porzioni più esterne), nonché la sua evoluzione procedendo con l'osservazione verso il centro della lesione. Se si tratta di lesioni molto piccole (1-2 cm), queste possono essere campionate interamente.*

L'esame microscopico consente di valutare se gli organismi identificati contribuiscono in modo significativo allo sviluppo della lesione o se possono essere coinvolti anche organismi non rilevati (Janke, 1995). Le lesioni istologiche sono talvolta suggestive dell'organismo responsabile.

- L'essudato alveolare rappresentato principalmente da edema e macrofagi associati a muco nelle vie aeree circondate da linfociti che causano *cuffing* peribronchiale sono fortemente indicativi di polmonite non complicata da *M. hyopneumoniae*, come in corso di EP (Caswell and Williams, 2015). La presenza di neutrofili alveolari e fibrina è indicativa di complicanze batteriche (Figura 11 A-C).

- La necrosi dell'epitelio delle vie aeree con lume pieno di detriti cellulari e leucociti è il segno distintivo dell'infezione da SIV (Caswell and Williams, 2015) (Figura 13A), ma dovrebbe essere considerata anche nelle infezioni da PRCV dove è limitata ai bronchioli piccoli e terminali (Janke, 1995) e nelle infezioni da PCV2 (Caswell and Williams, 2015) (Figura 12F).

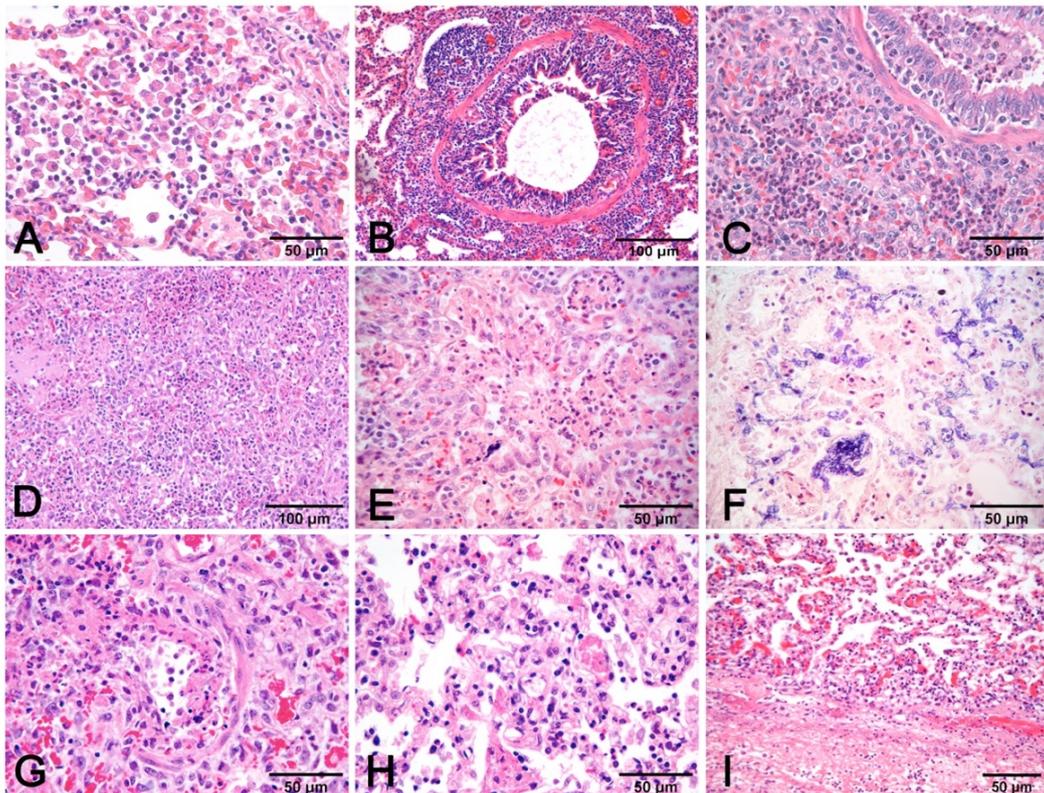


Figura 11. Polmonite caratterizzata da presenza di macrofagi negli spazi alveolari (A) e manicotti linfocitari peribronchiali (B); quando associati a quadri macroscopici di polmonite cranio-ventrale non complicata, questi reperti istologici sono indicativi di polmonite enzootica. Il riscontro di numerosi neutrofili nel lume delle vie aeree e negli alveoli (C) è indicativo di complicazioni batteriche secondarie. La necrosi del parenchima polmonare (D) e dell'essudato cellulare negli alveoli (E), la presenza alveolare di fibrina (F) associata con necrosi fibrinoide dei vasi (G), trombosi (H), e polmonite fibrinosa (I) sono alterazioni microscopiche indicative di pleuropolmonite per cui risulta imperativo la diagnosi eziologica, poiché quadri simili macro- e microscopici possono essere causati anche da batteri diversi da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (A-E, G-I): colorazione ematossilina eosina. (F): colorazione istochimica speciale, PTAH.

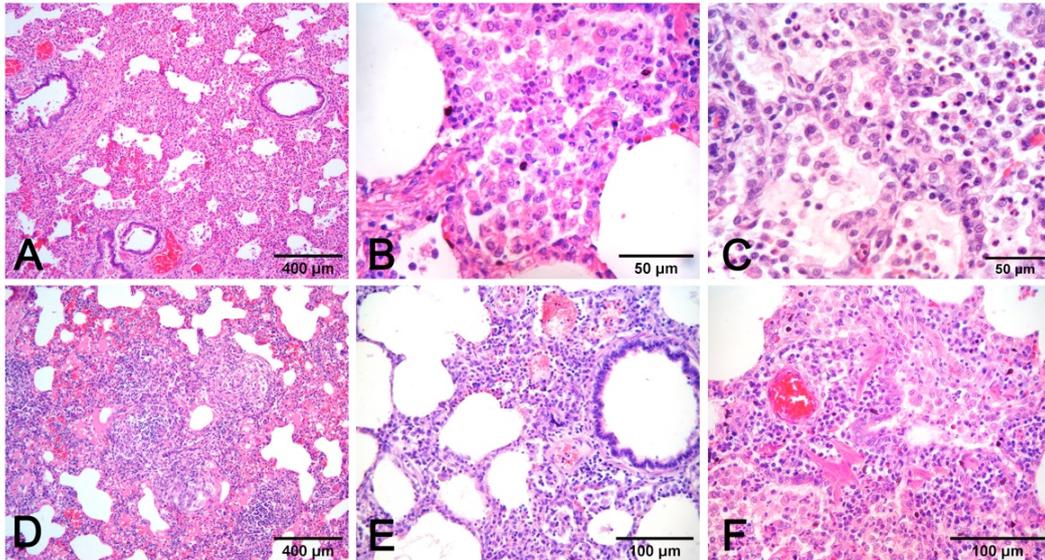


Figura 12. La polmonite interstiziale in corso di infezione da virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) (A-C) e quella da circovirus suino di tipo 2 (PCV2) (D-F) presentano caratteristiche simili e richiedono una differenziazione eziologica. Il pattern di infiammazione di tipo granulomatoso (D) manca in corso di infezione da PRRSV; è viceversa suggestivo di polmonite da PCV2. La polmonite da PRRSV è caratterizzata da essudazione alveolare di macrofagi frammentati a detriti necrotici (B) e da iperplasia degli pneumociti di tipo II (C) a livello di parete alveolare. Nella polmonite da PCV2 i setti alveolari sono ispessiti (E) e può esservi necrosi bronchiolare (F). Colorazione ematosilina eosina.

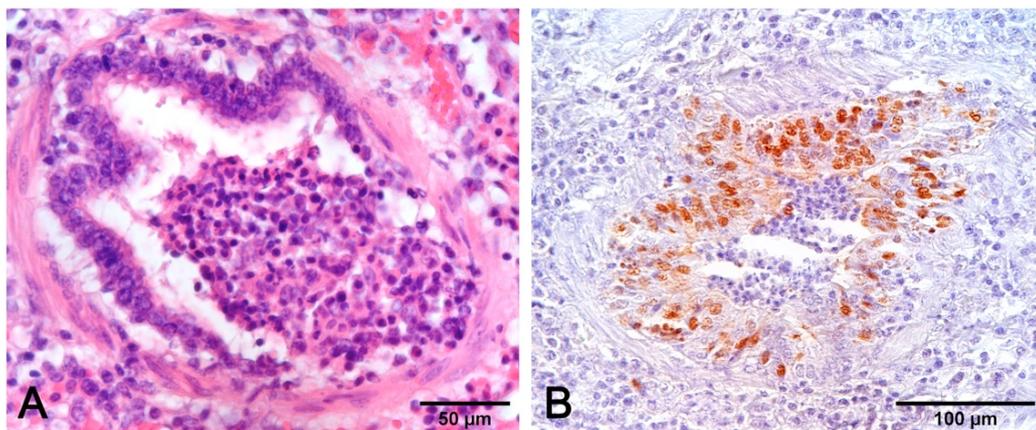


Figura 13. La necrosi dell'epitelio delle vie aeree (A) è una lesione tipica dell'infezione da SIV, ma non patognomonica. La possibilità di ottenere risultati immunoistochimici positivi per SIV (B) dipende strettamente dal momento dell'esecuzione della prova, poiché il virus è rapidamente eliminato dal polmone. I dati più significativi derivano da campionamento di animali con sintomi acuti recenti, in associazione ad altre indagini di laboratorio (PCR, sierologia). (A) ematosilina eosina; (B) IHC con anticorpo monoclonale anti-SIV, clone 1331. Meridian Life Science, Inc. (Sarli et al., 2021).

- La polmonite fibrinosa o necrotizzante con leucociti alveolari necrotici (principalmente neutrofili) e raccolta di fibrina, associata a trombosi vascolare

e necrosi murale fibrinoide con pleurite fibrino-emorragica spesso concomitante è altamente indicativa di infezione iperacuta/acuta da *A. pleuropneumoniae* (Figura 11 D-I). In questi casi l'isolamento/identificazione dell'agente eziologico è fondamentale, poiché lo stesso *pattern* istologico può essere attribuito ad *Actinobacillus suis*, salmonellosi setticemica e ceppi pleuritici di *P. multocida* (Yaeger and Alstine, 2019; Caswell and Williams, 2015).

- La polmonite interstiziale, caratterizzata da un ispessimento variabile delle pareti bronchiolari e alveolari, è un segno distintivo delle infezioni virali:
  - è generalmente lieve nella PRCV e da lieve a grave nell'infezione da PCV2 e PRRSV;
  - la polmonite interstiziale nell'infezione da PRRSV è caratterizzata da un'iperplasia prominente degli pneumociti di tipo II e da macrofagi necrotici intralveolari. È spesso associata a grave rinite (Janke, 1995) (Figura 12 A-C);
- la polmonite in corso di infezione da PCV2 è caratterizzata da spazio peribronchiale e setti alveolari ispessiti da linfociti e macrofagi con un *pattern* di polmonite da interstiziale a granulomatosa (Figura 13 D-E). Le lesioni polmonari sono più frequenti nella malattia sistemica associata al circovirus suino (PCV-SD) rispetto alla vera malattia respiratoria (Ticó et al., 2013). Altre caratteristiche sono la necrosi bronchiolare (Figura 12F) che progredisce verso la bronchiolite obliterante e la deplezione dei linfociti o la linfadenite granulomatosa nei linfonodi regionali o in altri tessuti linfoidei (Caswell and Williams, 2015).

- La PRV di solito non induce lesioni microscopiche riconoscibili nel polmone dei suini più anziani, ma in alcuni suini, solitamente più giovani, può essere presente necrosi focale del parenchima. La vasculite, la gliosi cerebrale focale e la meningite non suppurativa nell'encefalo sono le principali lesioni osservate (Janke, 1995). PRV può indurre anche grave rinite.

La polmonite proliferativa e necrotizzante è un *pattern* istologico di polmonite nei suini, caratterizzato da raccolta alveolare di macrofagi e detriti necrotici associati a iperplasia degli pneumociti di tipo II e setti alveolari ispessiti dall'infiltrazione di cellule infiammatorie (Caswell and Williams, 2015). Questo modello di malattia polmonare è condiviso da diversi agenti patogeni: principalmente infezioni da PRRSV e PCV2 (spesso coesistenti), ma anche PRV e SIV (Dea et al., 1992; Grau-Roma and Segalés, 2007; Morandi et al., 2010; Morin et al., 1990).

L'istopatologia dispone di tecniche ad alta specificità come l'IHC e l'ISH, che rispettivamente permettono di evidenziare nei tessuti l'antigene o il genoma di un dato agente infettivo; ciò consente di aumentare la sensibilità della diagnosi permettendo la rilevazione degli antigeni specifici di un determinato patogeno in associazione con le lesioni caratteristiche, il che è utile a stabilire il nesso causale tra patogeni e malattia (Driemeier et al., 2002; Gupta et al., 2009).

Nel caso della PRDC del suino, la presenza di polmonite broncointerstiziale e dell'antigene PCV2 nei macrofagi infiltranti è indicativa del ruolo del PCV2 nell'eziologia della polmonite (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012). Nel polmone, l'antigene o genoma del PCV2 può essere rilevato principalmente nel citoplasma dei macrofagi e delle cellule dendritiche, ma

anche nei monociti, nelle cellule epiteliali bronchiali e nelle cellule endoteliali (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012; Ticó et al., 2013). La combinazione di IHC e istologia consente inoltre di visualizzare l'antigene del PRRSV nel citoplasma delle cellule infette: l'antigene PRRSV si osserva principalmente nel citoplasma dei macrofagi alveolari, degli pneumociti di tipo II e nelle cellule epiteliali bronchiali (Grau-Roma and Segalés, 2007; Han et al., 2012; Zimmerman et al., 2019) (Figura 14).

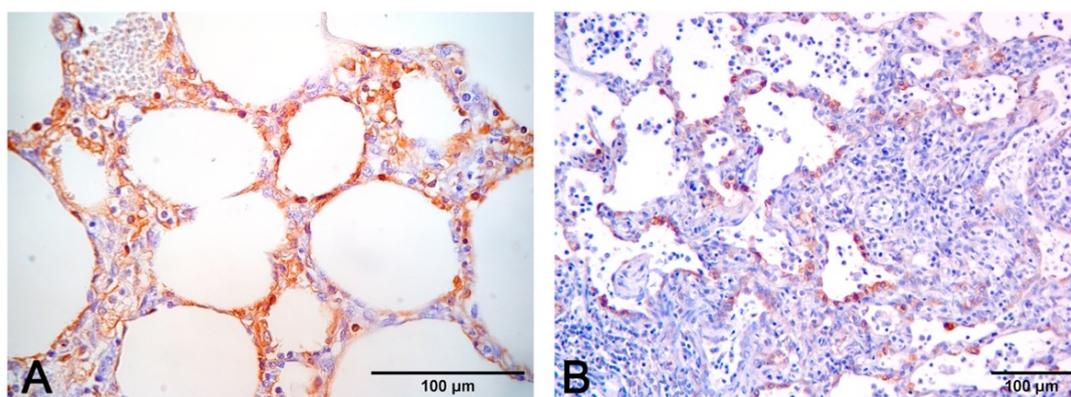


Figura 14. (A) la colorazione immunostochimica per PCV2 (anticorpo monoclonale anti-PCV2, clone F217) mette in evidenza macrofagi positivi per l'antigene virale nei setti alveolari. (B) la colorazione immunostochimica per PRRSV (anticorpo monoclonale anti-PRRSV, clone SDOW17-A) evidenzia la presenza dell'antigene negli pneumociti di tipo II iperplastici e in rari macrofagi nell'interstizio (Sarli et al., 2021).

Allo stesso modo, i test istopatologici possono essere utilizzati anche per rilevare acidi nucleici batterici o antigeni, ad esempio per diagnosticare micoplasmosi respiratoria o infezioni da *A. pleuropneumoniae* (Hennig-Pauka et al., 2012; Hoeltig et al., 2018; Pereira et al., 2017). Nel polmone, *M. hyopneumoniae* è localizzato sulla superficie delle cellule epiteliali bronchiali e bronchiolari (Park et al., 2014a), mentre *A. pleuropneumoniae* si lega alle cellule epiteliali respiratorie dei bronchioli terminali e agli pneumociti (Saade et al., 2020).

Nella diagnosi della malattia respiratoria del suino, il contributo della patologia deriva dall'identificazione del *pattern* macroscopico delle lesioni polmonari e dalla caratterizzazione istologica delle lesioni. Il maggior limite è rappresentato

dall'eventualità di forme complicate di malattia, che riducono l'affidabilità dei *pattern* macroscopici e microscopici. Questo *bias* può essere ridotto mediante un opportuno campionamento su animali con lesioni recenti e acute o integrando i riscontri patologici con altre indagini in caso di lesioni croniche e complicate.

### *1.3.3 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie respiratorie del suino*

Nella PRDC, gli agenti patogeni con solo tropismo respiratorio raggiungono il bersaglio per via aerogena determinando lo sviluppo di lesioni visibili nelle vie aeree e nel parenchima polmonare. In tali casi, ai fini della diagnosi è indispensabile, ma anche sufficiente, il campionamento delle vie aeree e di porzioni di parenchima polmonare (per indagini eziologiche o istologiche). Viceversa, nel caso delle malattie infiammatorie polmonari a patogenesi ematogena, nel polmone si osserva l'estensione del processo patologico generatosi in altri organi spesso più idonei al prelievo per ottenere le indicazioni diagnostiche necessarie (Tabella 1). In questi casi l'attenzione dovrebbe essere focalizzata sul polmone, ma anche sugli organi linfoidi (PCV2, PRRSV) e sui processi settici extrapolmonari presenti in diverse sedi, che, insieme ai risultati ottenuti dal prelievo polmonare, hanno maggiore valore nel fornire indicazioni eziologiche (Sarli et al., 2021).

Tabella 1. Campionamento per l'esame istopatologico della PRDC del suino (Sarli et al., 2021).

Eziologia/malattia sospettata		Tessuti/campioni	Freschi / Fissati (10% formalina tamponata)
Tropismo sistemico  es. PCV2 PRRSV PRV  <i>M. hyorinis</i>		Polmoni	Dalle aree affette con aspetti macroscopici differenti (lobi craniali e medi, e porzioni craniali dei lobi caudali con vie aeree visibili)
		Linfonodi	Mandibolari, sternali, tracheobronchiali, mesenterici, e inguinali superficiali
		Tonsille	Monolaterale
		Milza	Porzione rappresentativa della lesione o casuale in caso di assenza di lesioni
		Cuore (PCV2; <i>M. hyorinis</i> )	Ventricolo destro e sinistro e setto
		Encefalo (PRV)	Porzione rappresentativa della lesione o casuale in caso di assenza di lesioni
<i>Tropismo respiratorio</i>  es. <i>M. hyopneumoniae</i> <i>A. pleuropneumoniae</i>	Vie aeree superiori  Vie aeree inferiori	Turbinati nasali  Polmoni	1 cm di spessore  Dalle aree affette con aspetti macroscopici differenti (lobi craniali e medi, e porzioni craniali dei lobi caudali con vie aeree visibili)

## 1.4 Approccio orientato al problema: le patologie enteriche del suino

In corso di esame necroscopico, all'esame visivo in sito dell'apparato gastroenterico segue l'asportazione *in toto* del pacchetto gastro-intestinale, previa esecuzione di doppie legature, a monte presso il cardias e a valle a livello di tratto terminale del retto, ed incisione nel mezzo tra le stesse. Quindi tramite trazione caudale e attraverso la recisione delle connessioni legamentose è possibile estrarre

tutto l'apparato gastrointestinale. Gli organi parenchimatosi tra cui fegato, milza, linfonodi e reni, vengono campionati comprendendo sempre porzioni di tessuto fresco per indagini diagnostiche collaterali e porzioni per la fissazione in formalina. I linfonodi intestinali (soprattutto il mesenterico e il gastroepatico) dovrebbero essere sempre esaminati per la dimensione, la consistenza e la presenza di emorragie. Quando si sospetta una malattia enterica, vengono effettuate di *routine* le incisioni longitudinali di più sezioni dell'intestino tenue e crasso per ispezionare la mucosa. Si esamina dunque l'ileo, facilmente individuabile trovando il cieco e seguendo il legamento fino all'ileo. Una volta che tutti gli organi addominali sono stati campionati, può essere aperto lo stomaco tagliando lungo la curvatura maggiore. Si nota la presenza o l'assenza di mangime così come la presenza o l'assenza di ulcere o emorragie. Nei suini, le ulcere gastriche si trovano nella porzione non ghiandola dello stomaco, nota anche come *pars esofagea* che deve essere attentamente esaminata per escludere la presenza di ulcere gastriche o l'ipercheratosi che ne rappresenta la lesione prodromica (Arruda and Gauger, 2019).

La diagnosi delle patologie enteriche nel suino rappresenta una sfida in tutte le categorie produttive. Come nel caso delle malattie respiratorie, si tratta di affezioni multifattoriali e spesso polimicrobiche in cui possono essere coinvolti più microrganismi; inoltre, molti patogeni come *Clostridium perfringens* tipo A, Rotavirus e *L. intracellularis*, possono essere presenti a livello intestinale anche senza segni clinici e non necessariamente, soprattutto se in assenza di lesioni, costituiscono la causa di malattia (Luppi et al., 2023).

Le malattie enteriche di origine infettiva nella mandria hanno una distribuzione legata all'età che riflette l'epidemiologia di ciascun patogeno

nell'allevamento (Figura 15) (Segalés et al., 2013). Per questo motivo, l'età degli animali colpiti da un focolaio di malattia può aiutare il veterinario a focalizzarsi sugli agenti eziologici più probabili, in base all'età in cui sono più comunemente riscontrati.

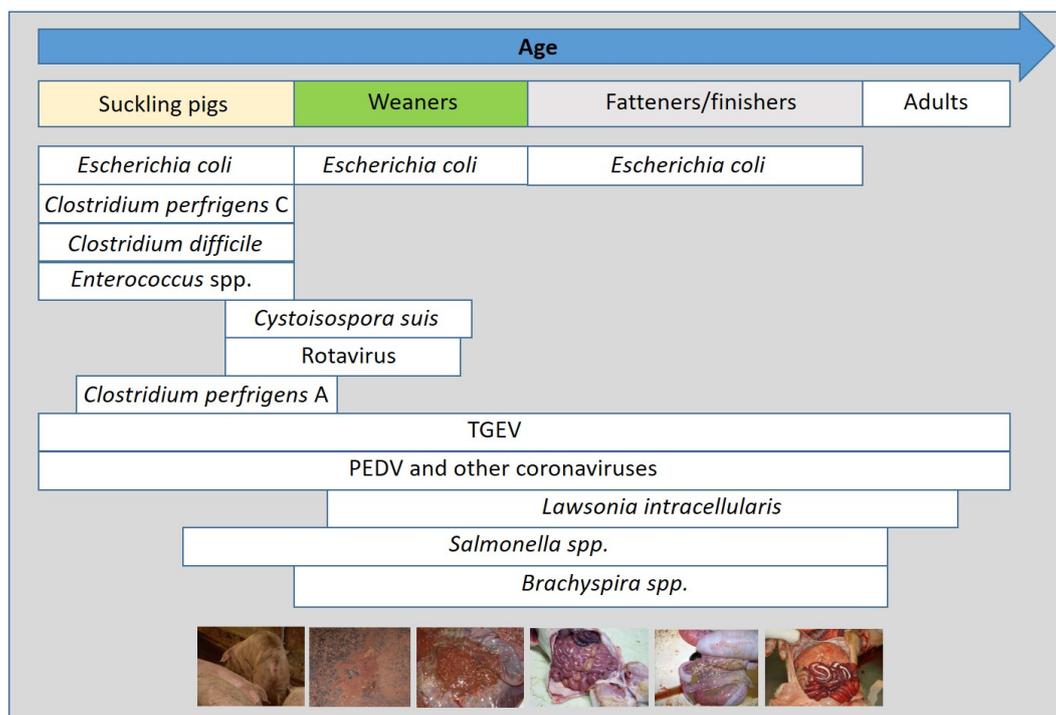


Figura 15. Principali patogeni delle malattie enteriche del suino in relazione alle categorie produttive (Luppi et al., 2023).

L'autopsia può fornire indicazioni utili per l'orientamento nella diagnosi, anche se, nella maggior parte dei casi, non è possibile giungere ad una diagnosi definitiva basata unicamente sui reperti macroscopici osservati. Le informazioni raccolte durante l'autopsia, come il tipo di enterite (catarrale, fibrinosa, necrotica ecc.), la localizzazione delle lesioni (intestino tenue e/o crasso) (Figura 16) e la sua distribuzione (focale, diffusa, segmentale ecc.) possono migliorare la formulazione di una diagnosi differenziale (Segalés et al., 2013).

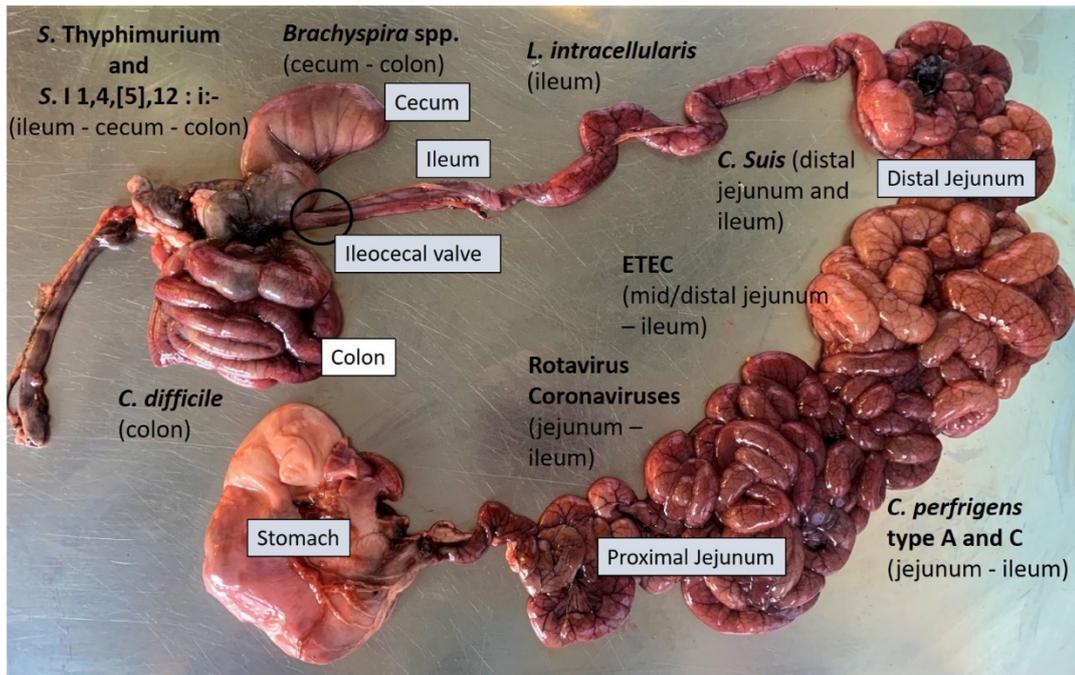


Figura 16. Pacchetto gastro-intestinale di suino. Principale localizzazione delle lesioni correlate ai corrispettivi agenti eziologici (Luppi et al., 2023).

A seconda dei casi, l'istopatologia può essere compresa tra le indagini diagnostiche complementari o tra le tecniche diagnostiche d'elezione.

Per esempio la Colibacillosi del suino difficilmente può essere differenziata dalle altre comuni cause di diarrea solo sulla base dell'aspetto macroscopico delle lesioni, rappresentate da anse intestinali dilatate, meteoriche, edematose ed iperemiche (Uzal et al., 2016). La diagnosi si basa sull'isolamento di ceppi patogeni di *E.coli* coinvolti nell'episodio attraverso l'esame batteriologico seguito dall'identificazione di fattori di virulenza (PCR); l'istopatologia in questo caso si configura come esame complementare, permettendo talvolta di evidenziare bacilli basofili adesi alla superficie degli enterociti (Luppi, 2017).

L'infezione da *Clostridium perfringens* tipo C determina un'enterite necro-emorragica/fibrinonecrotica fatale nei suinetti sotto le tre settimane d'età. Tipicamente le lesioni sono di tipo segmentale, localizzate prevalentemente a livello di piccolo intestino, con presenza eventuale di pseudomembrane

fibrinose sulla mucosa. La diagnosi finale di clostridiosi è condotta tramite esame batteriologico quantitativo seguito da genotipizzazione degli isolati con PCR *multiplex* per i geni che codificano per la beta-tossina (Posthaus et al., 2020). L'istopatologia è qui impiegata come tecnica complementare di conferma (Luppi et al., 2023).

Tra i patogeni virali, specie di Rotavirus rappresentano un'importante causa di sindromi diarroiche; le infezioni variano da forme subcliniche fino a gravi forme cliniche di malattia. Le lesioni causate da rotavirus tipo A, B e C possono essere segmentali e coinvolgere solo brevi tratti di intestino: macroscopicamente la parete intestinale risulta assottigliata e la corrispondente lesione microscopica è caratterizzata da grave atrofia dei villi intestinali con riduzione del rapporto altezza dei villi/profondità delle cripte, fusione dei villi, disepitelizzazione e desquamazione degli enterociti nel lume. L'istopatologia è in questo caso una utile metodica di conferma diagnostica dopo lo *screening* con PCR, per confermare la presenza delle lesioni caratteristiche; se suggestive di rotavirus, in base alla disponibilità di sonde e anticorpi, l'IHC e l'ISH consentono di correlarle rispettivamente con la presenza dell'antigene o del genoma virale (Almeida et al., 2018; Luppi et al., 2023).

Nel caso dell'enteropatia proliferativa del suino (PE), malattia infettiva causata dal batterio intracellulare obbligato *L. intracellularis*, l'istopatologia e l'IHC rappresentano il *gold standard* diagnostico. La diagnosi di PE acuta, nella forma di enterite necro-emorragica, e cronica nella forma definita adenomatosi intestinale, è condotta sulla base dell'osservazione delle lesioni macroscopiche e microscopiche caratteristiche con la rilevazione dell'antigene mediante IHC nel contesto delle lesioni, rappresentate da grave iperplasia delle cellule delle cripte intestinali (D'Annunzio et al., 2021).

Infine, in infezioni sistemiche come in corso di forme setticemiche di Salmonellosi, se i segni clinici e le lesioni compatibili sono confermati dall'isolamento di Salmonella e dalla identificazione di specie, è importante avere la nozione che un corretto campionamento per l'esame istologico, di tratti intestinali ma anche di porzioni di fegato, può avere alto valore diagnostico. Infatti se nell'intestino il rilievo di enterite fibrino-necrotica e la trombosi delle venule della mucosa possono essere un reperto aspecifico comune ad altri patogeni, nel fegato, come reperto tipico di salmonellosi possono essere osservate le caratteristiche lesioni necrotiche randomizzate nel parenchima epatico, note come *paratyphoid nodules* (Uzal et al., 2016).

#### *1.4.1 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie enteriche del suino*

I patogeni responsabili di patologia enterica generalmente hanno una distribuzione delle lesioni di tipo segmentale ed interessano specifici tratti dell'apparato gastroenterico (Figura 16). Di conseguenza ci si aspetta di poter osservare le lesioni caratteristiche nei distretti *target*: ad esempio nelle rotavirosi l'atrofia e fusione dei villi intestinali si apprezza prevalentemente a livello di piccolo intestino (digiuno e ileo); in corso di enteropatia proliferativa da *L. intracellularis* l'iperplasia delle cripte intestinali coinvolge le ghiandole nella porzione terminale dell'ileo; la dissenteria suina da *Brachyspira hyodysenteriae* e la spirochetosi intestinale da *Brachyspira pilosicoli* coinvolgono soprattutto il colon, causando coliti muco- e fibrino-catarrali (Uzal et al., 2016). Ai fini dell'osservazione delle lesioni istopatologiche è necessario che i campioni

(Tabella 2) vengano prelevati da soggetti deceduti di recente e provvedere alla rapida fissazione in formalina per bloccare i normali fenomeni di autolisi post-mortale, di rapida insorgenza soprattutto a livello di mucosa intestinale.

*Tabella 2. Campionamento per l'esame istopatologico nelle malattie enteriche del suino (Luppi et al., 2023).*

<b>Patologie enteriche</b>	<b>Tessuti/campioni</b>	<b>Fissati (10% formalina tamponata)</b>
	Linfonodo	Mesenterico
	Tonsilla	Monolaterale
	Milza	1x1x1
	Fegato	1x1x1
	Rene	Sezione a spicchio comprendete porzione corticale e midollare (1x1x1)
	Stomaco	3x3x3
	Digiuno	Tre sezioni di 2 cm
	Ileo	Tre sezioni di 2 cm
	Colon spirale	Tre sezioni di 2 cm

## **1.5 Approccio orientato al problema: la patologia riproduttiva**

I problemi riproduttivi nelle scrofe sono da annoverare tra quelli che incidono maggiormente sulla produzione. Numerosi agenti infettivi possono essere causa di patologie riproduttive, che nelle scrofe in gestazione tardiva possono manifestarsi con aborti, suinetti nati morti e/o nati deboli o parti prematuri. La diagnosi di morte fetale è una diagnosi complessa a causa dell'ampia gamma di processi associati alla

mortalità in utero, comprese cause non infettive quali le ormonali, genetiche, nutrizionali, tossiche e metaboliche (Christianson, 1992).

Nei suini, l'aborto infettivo può essere dovuto all'infezione di una o più unità feto-placentari o agli effetti della patologia sistemica in fase acuta nella scrofa in gestazione: se clinicamente malata con segni di malattia sistemica come febbre, inappetenza, letargia, malattia respiratoria o enterica, l'agente può essere ricercato nei tamponi nasali, bronchiali e fluidi polmonari o orali di scrofe malate o morte (Althouse et al., 2019).

Gli studi hanno dimostrato che la batteriemia o la viremia materna possono provocare l'infezione di uno o più feti, con successiva diffusione nell'utero da feto a feto (Nielsen et al., 1991). L'infezione di un feto può provocare una serie di esiti, tra cui morte e riassorbimento embrionale, morte fetale e mummificazione, aborto, suini nati morti o disvitali, con mortalità neonatale aumentata (Christianson 1992). Lo stadio della gestazione e la diffusione in utero dei patogeni influenzano la presentazione clinica della malattia riproduttiva: l'infezione all'inizio della gestazione può portare alla morte embrionale e al riassorbimento di alcuni feti, con conseguente diminuzione delle dimensioni della nidata. Il completo riassorbimento dei feti indica morte fetale avvenuta prima del 35° giorno di gestazione. Dopo 35 giorni si verifica la mineralizzazione dell'osso fetale, quindi i feti che muoiono diventano mummificati. I feti infetti dopo 65-70 giorni di gestazione possono essere nati vivi ma sieropositivi al patogeno (Nielsen et al., 1991). Clinicamente, questo scenario di infezione sequenziale può manifestarsi come feti mummificati di dimensioni variabili con alcuni suinetti nati vivi apparentemente normali al parto.

I feti dovrebbero essere sterili quindi l'identificazione di un agente è solitamente un risultato significativo, anche se la contaminazione dei campioni con agenti normalmente presenti nelle feci come Parvovirus (PPV), PCV2 e flora batterica endemica non è rara; il risultato deve essere interpretato alla luce del fatto che la semplice individuazione non indica la causalità. Anche in questo caso l'istopatologia è uno strumento molto utile per le indagini diagnostiche di *routine* in quanto può collegare un agente alla rispettiva lesione tipica o prevista. L'istopatologia può anche identificare lesioni tissutali di origine sconosciuta, portando ad un'analisi più approfondita (Althouse et al., 2019).

Dal punto di vista economico, gli agenti virali sono considerati la causa infettiva più significativa di fallimento riproduttivo nel suino; sono associati a patologia riproduttiva numerosi virus, tra cui PRRSV, PPV, PCV2, il virus della malattia di Aujeszky (o virus della pseudorabbia - PRV), il virus dell'influenza A (IAV), virus dell'encefalomiocardite (EMCV), enterovirus suino (PEV), e negli ultimi anni si è aggiunto il circovirus suino tipo 3 (PCV3) (Saporiti et al., 2021).

L'avvento della PCR per l'identificazione delle infezioni virali negli aborti ha migliorato le *performance* delle indagini diagnostiche, trattandosi di una metodica che può essere applicata su un'ampia gamma di campioni, inclusi tessuti autolitici e feti mummificati. Tuttavia, molto spesso, alla positività in PCR per alcuni virus (PRRSV, PCV2 (Maldonado et al., 2005; Saporiti et al., 2021), PCV3 (Faccini et al., 2017; Temeeyasen et al., 2020) non sempre corrisponde l'evidenza di una lesione istologica tipica, come quelle caratteristiche di infezione virale rappresentate generalmente da encefalite non suppurativa, miocardite, vasculite e lesioni necrotizzanti in più tessuti. Le lesioni microscopiche sono un reperto maggiormente indicativo di aborto infettivo da causa virale, considerando che molto spesso non si osservano lesioni

macroscopiche (Althouse et al., 2019; Arruda et al., 2019). La causalità degli agenti nel determinismo della patologia riproduttiva può essere stabilita associando i risultati delle indagini biomolecolari alla presenza di lesioni microscopiche e all'evidenza del genoma/antigene del patogeno nel contesto delle lesioni caratteristiche, come dimostrato per esempio da Saporiti et al., per il PCV3.

*Leptospira* spp., *Brucella suis*, *Chlamydia* spp. possono essere cause batteriche di infertilità, mummificazione fetale, aborto, natimortalità e di nascita di suinetti disvitali in allevamento. Le lesioni macroscopiche indicative di aborto batterico sono rare ma possono includere ittero fetale, splenomegalia, essudato fibrinoso sulla superficie dei visceri addominali o toracici o emorragia e necrosi della placenta. L'assegnazione dei ruoli causali ai batteri isolati dalla placenta come agente causale dell'aborto dipende sia dalla conferma di una lesione compatibile (ad es. placentite acuta) mediante istologia sia dal risultato di una coltura batterica (Althouse et al., 2019).

### *1.5.1 Campionamento finalizzato all'esame istopatologico per la diagnosi delle patologie riproduttive del suino*

Dipendentemente dalla disponibilità di test diagnostici *in situ* (IHC, ISH), gli agenti infettivi che infettano e replicano nei feti possono essere rilevati nei tessuti fetali e/o nella placenta se viene esaminato un numero sufficiente di campioni. Non tutti i feti in una nidata sono infetti al momento dell'aborto; pertanto la diagnosi dell'agente eziologico può non essere conclusiva se viene valutato un numero limitato di feti. Una raccomandazione generale è di

campionare 4-6 feti per figliata da almeno 3 nidiate. Ciò si basa su un calcolo che assume un tasso di infezione fetale del 50% ed una nidiate di 12, per ottenere che 90-95% dei casi almeno un feto risulti infetto (Benson et al., 2002). Ciascun agente infettivo può determinare lesioni visibili o meno nei tessuti fetali e nella placenta (Tabella 3); un campionamento completo dei principali tessuti *target* di lesioni microscopiche per i principali patogeni coinvolti nella patologia riproduttiva del suino (Tabella 4), permette di oggettivare il ruolo dei patogeni identificati con altre tecniche diagnostiche.

Tabella 3. Esempi di agenti infettivi coinvolti nella patologia riproduttiva del suino e rispettive lesioni.

<b>Eziologia</b>	<b>Problemi riproduttivi</b>	<b>Lesioni fetali macroscopiche</b>	<b>Lesioni fetali microscopiche</b>
PRRSV	Aborto tardivo, natimortalità, suinetti disvitali	Edema ed emorragie segmentali del cordone ombelicale; macchie di meconio cutanee	Infiltrato linfoplasmocitario ed istiocitario periarteriolare in cordone ombelicale, arterite e lieve polmonite interstiziale nel polmone, lieve epatite necrotizzante
PCV2	Natimortalità, suinetti disvitali, mummificazione fetale	Ipertrofia cardiaca, congestione epatica, versamenti cavitari	Degenerazione, edema e necrosi del miocardio
PCV3	Aborto e natimortalità	Non evidenti	Arterite e periarterite
PPV	Morte embrionale, mummificazione fetale	Feti mummificati	Infiltrato mononucleare nelle meningi, nell'interstizio renale, nelle regioni portali del fegato, nel corionallantoide
PRV	Infertilità, riassorbimento e mummificazione fetale, aborto, natimortalità	Focolai di necrosi in fegato, milza e polmone	Necrosi coagulativa in fegato, milza, surrenali, e nei villi coriali della placenta
EMCV	Aborto, natimortalità, suinetti disvitali	Idrotorace, idropericardio, ascite, focolai bianco-opachi cardiaci	Miocardite, necrosi del miocardio
<i>Leptospira</i>	Infertilità, mummificazione fetale, aborto, natimortalità, suinetti disvitali	Occasionalmente ittero fetale	Edema placentare, necrosi e infiammazione in organi multipli
<i>Brucella suis</i>	Infertilità, aborto, natimortalità, suinetti disvitali	Placentite	Emorragie ed edema placentare, placentite
<i>Chlamydia spp.</i>	Aborto, natimortalità, suinetti disvitali	Non evidenti	Placentite

Tabella 4. Campionamento per l'esame istopatologico nella patologia riproduttiva del suino (modificata da: Althouse et al., 2019).

<b>Patologia riproduttiva</b>	<b>Tessuti/campioni</b>	<b>Fissati (10% formalina tamponata)</b>
<b>natimortalità, mummificazione fetale, morte embrionale, infertilità, aborto</b>	Encefalo	In toto
	Cuore	Ventricolo destro e sinistro e setto
	Polmone	1x1x1
	Fegato	1x1x1
	Milza	1x1x1
	Rene	Sezione a spicchio comprendete porzione corticale e midollare (1x1x1)
	Placenta	Porzione rappresentativa della lesione o casuale in caso di assenza di lesioni

## Bibliografia

- Almeida, P.R., Lorenzetti, E., Cruz, R.S., Watanabe, T.T., Zlotowski, P., Alfieri, A.A., Driemeier, D., 2018. Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30, pp. 370-376.
- Althouse, G.C., Kauffold, J., Rossow, S., 2019. Diseases of the Reproductive System, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 373–392.
- Amadori, M., Zanotti, C., 2016. Immunoprophylaxis in intensive farming systems: the way forward. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 181, 2–9.
- Arruda, B., Piñeyro, P., Derscheid, R., Hause, B., Byers, E., Dion, K., Long, D., Sievers, C., Tangen, J., Williams, T., Schwartz, K., 2019. PCV3-associated disease in the United States swine herd. *Emerging Microbes & Infections* 8, 684–698.
- Arruda, P.H.E., Gauger, P., 2019. Optimizing Sample Selection, Collection, and Submission to Optimize Diagnostic Value, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 98–111.
- Bai, X., Wang, Y., Xu, X., Sun, Z., Xiao, Y., Ji, G., Li, Y., Tan, F., Li, X., Tian, K., 2016. Commercial vaccines provide limited protection to NADC30-like PRRSV infection. *Vaccine* 34, 5540–5545.
- Benson, J.E., Yaeger, M.J., Christopher-Hennings, J., Lager, K., Yoon, K.-J., 2002. A Comparison of Virus Isolation, Immunohistochemistry, Fetal Serology, and Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Transplacental Infection in the Fetus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 8–14.
- Burrough, E.R., Baum, D.H., Schwartz, K.J., 2019. Collecting Evidence and Establishing Causality, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 112–122.
- Caswell, J.L., Williams, K.J., 2015. Respiratory System, in: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2*. Elsevier, 465–591.
- Christianson, W.T., 1992. Stillbirths, Mummies, Abortions, and Early Embryonic Death. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 8, 623–639.

- Craig, L.E., Dittmer, K.E., Thompson, K.G., 2016. Bones and Joints, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 1. Elsevier, 16–163.
- D'Annunzio, G., Brdini, R., Ostanello, F., Sarli, G., 2021. Porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Large Animal Review* 27, 149–163.
- Dada, M.A., Ansari, N.A., 1996. Origins of .... the postmortem examination in diagnosis. *Journal of clinical pathology* 49, 965–6.
- De las Heras Guillamòn M., García de Jalón J.A. 2004. Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina. *Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia*, vol.56.
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R., Montpetit, C., Martineau, G.P., 1992. Antigenic Variant of Swine Influenza Virus Causing Proliferative and Necrotizing Pneumonia in Pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 380–392.
- Driemeier, D., Faccini, G.S., de Oliveira, R.T., Colodel, E.M., Traverso, S.D., Cattani, C., 2002. Silver staining combined with alcian blue and hematoxylin-eosin for the detection of *Lawsonia intracellularis* in swine proliferative enteropathy. *Acta histochemica* 104, 285–287.
- Drolet, R., Sylvie, D., Thomson, J. R., Done, S. H. 1999. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Journal of Swine Health and Production*, 7(6), 283–285.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 39, 44–51.
- Evenson, D., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Halbur, P.G., Wang, C., Tian, D., Ni, Y.Y., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2016. A porcine reproductive and respiratory syndrome virus candidate vaccine based on the synthetic attenuated virus engineering approach is attenuated and effective in protecting against homologous virus challenge. *Vaccine* 34, 5546–5553.
- Faccini, S., Barbieri, I., Gilioli, A., Sala, G., Gibelli, L.R., Moreno, A., Sacchi, C., Rosignoli, C., Franzini, G., Nigrelli, A., 2017. Detection and genetic

- characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 1661–1664.
- Grau-Roma, L., Segalés, J., 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Veterinary Microbiology* 119, 144–151.
- Guarneri, F., Tresoldi, E.T., Sarli, G., Boniotti, M.B., Lelli, D., Barbieri, I., Bacci, B., D'Annunzio, G., Amadori, M., 2021. Protective immunity in swine induced by Porcine Circovirus 2b inactivated vaccines with different antigen payload. *Veterinary Microbiology* 252, 108887.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Winkelman, N.L., Mackie-nuss, R.A.C., Marsteller, T.A., Deen, J., 2002. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy *Résumé* 99–107.
- Gupta, E., Bhalla, P., Khurana, N., Singh, T., 2009. Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. *Indian journal of medical microbiology* 27, 100–6.
- Haines, D.M., West, K.H., 2005. Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Veterinary immunology and immunopathology* 108, 151–156.
- Halbur, P.G., Andrews, J.J., Huffman, E.L., Paul, P.S., Meng, X.J., Niyo, Y., 1994. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 6, 254–257.
- Han, G., Xu, H., Wang, Y., Liu, Z., He, F., 2020. Efficacy evaluation of two commercial vaccines against a recombinant PRRSV2 strain ZJnb16-2 from lineage 8 and 3 in china. *Pathogens* 9, 1–12.
- Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Kang, S.H., Kim, S.-H., Lee, B.-H., Kwon, B., Chae, C., 2012. Evaluation of monoclonal antibody-based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 719–724.

- Hansen, M.S., Pors, S.E., Bille-Hansen, V., Kjerulff, S.K.J., Nielsen, O.L., 2010a. Occurrence and tissue distribution of porcine circovirus type 2 identified by immunohistochemistry in danish finishing pigs at slaughter. *Journal of Comparative Pathology* 142, 109–121.
- Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010b. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology* 143, 120–131.
- Hennig-Pauka, I., Koch, R., Hoeltig, D., Gerlach, G.F., Waldmann, K.H., Blecha, F., Brauer, C., Gasse, H., 2012. PR-39, a porcine host defence peptide, is prominent in mucosa and lymphatic tissue of the respiratory tract in healthy pigs and pigs infected with *actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Research Notes* 5, 1–7.
- Hoeltig, D., Rohde, J., Frase, R., Nietfeld, F., Waldmann, K.H., Valentin-Weigand, P., Meens, J., 2018. Multi-organ spreading of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in weaned pigs during the first week after experimental infection. *Veterinary Research* 49, 1–11.
- Hofman, P., Lucas, S., Jouvion, G., Tauziède-Espariat, A., Chrétien, F., Cathomas, G., 2017. Pathology of infectious diseases: what does the future hold? *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 470, 483–492.
- Janke, B.H., 1995. Diagnosis of viral respiratory disease in swine. *Swine Health and Production.*, 3, 116–120.
- Kedkovid, R., Woonwong, Y., Arunorat, J., Sirisereewan, C., Sangpratum, N., Lumyai, M., Kedsangsakonwut, S., Teankum, K., Jittimane, S., Thanawongnuwech, R., 2018. Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). *Veterinary Microbiology* 215, 71–76.
- Kim, D., Ha, Y., Lee, Y.-H., Chae, S., Lee, K., Han, K., Kim, J., Lee, J.-H., Kim, S.-H., Hwang, K.-K., Chae, C., 2009. Comparative study of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine circovirus 2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of veterinary medical science* 71, 1001–4.
- Kim, S.-H., Park, J.-Y., Jung, J., Kim, H., Park, Y.-R., Lee, K., Lyoo, Y.S., Yeo, S., Park, C., 2018. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3

- from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea. *Journal of Veterinary Science* 19, 721.
- Luppi, A. 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porc. Health Manag*, 3, pp. 1-18.
- Luppi, A., D'Annunzio, G., Torreggiani, C., Martelli, P., 2023. Diagnostic Approach to Enteric Disorders in Pigs. *Animals*. 2023; 13(3):338.
- Maes, D.G.D., Dewulf, J., Piñeiro, C., Edwards, S., Kyriazakis, I., 2020. A critical reflection on intensive pork production with an emphasis on animal health and welfare. *Journal of animal science* 98, S15–S26.
- Maldonado, J., Segalés, J., Martínez-Puig, D., Calsamiglia, M., Riera, P., Domingo, M., Artigas, C., 2005. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal* 169, 454–456.
- Maxie, M.G., Miller, M.A., 2016. Introduction to the Diagnostic Process, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1. Elsevier, 1-15.
- Morandi, F., Ostanello, F., Fusaro, L., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V., Leotti, G., Joisel, F., Sarli, G., 2010. Immunohistochemical Detection of Aetiological Agents of Proliferative and Necrotizing Pneumonia in Italian Pigs. *Journal of Comparative Pathology* 142, 74–78.
- Morin M., Girard C., Elazhary Y., Fajardo R., Drolet R., L.A., 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 31, 837.
- Nielsen, J., Rønsholt, L., Sørensen, K.J., 1991. Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary Microbiology* 28, 1–11.
- Niewold, T.A., van Essen, G.J., Nabuurs, M.J.A., Stockhofe-Zurwieden, N., van der Meulen, J., 2000. A review of porcine pathophysiology: A different approach to disease. *Veterinary Quarterly* 22, 209–212.
- Ober, R.A., Thissen, J.B., Jaing, C.J., Cino-Ozuna, A.G., Rowland, R.R.R., Niederwerder, M.C., 2017. Increased microbiome diversity at the time of infection is associated with improved growth rates of pigs after co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology* 208, 203–211.

- Oliver-Ferrando, S., Segalés, J., López-Soria, S., Callén, A., Merdy, O., Joisel, F., Sibila, M., 2018. Exploratory field study on the effect of Porcine circovirus 2 (PCV2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV2 subclinically infected sow herd. *BMC Veterinary Research* 14, 130.
- Opriessnig, T., Castro, A.M.M.G., Karuppanan, A.K., Gauger, P.C., Halbur, P.G., Matzinger, S.R., Meng, X.J., 2019. A Porcine circovirus type 2b (PCV2b)-based experimental vaccine is effective in the PCV2b-*Mycoplasma hyopneumoniae* coinfection pig model. *Vaccine* 37, 6688–6695.
- Opriessnig, T., Meng, X.-J., Halbur, P.G., 2007. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 591–615.
- 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. *Veterinary Pathology* 41, 624–640.
- Park, C., Seo, H.W., Park, S.J., Han, K., Chae, C., 2014b. Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* 95, 2486–2494.
- Park, S.J., Seo, H.W., Park, C., Chae, C., 2014a. Interaction between single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines on dually infected pigs. *Research in Veterinary Science* 96, 516–522.
- Pereira, C.E.R., Vannucci, F.A., Gabardo, M. de P., dos Santos, L.F., Mores, N., Guedes, R.M.C., 2017. *Mycoplasma hyorhinis* infection in early cases of mycoplasmal pneumonia in swine and evaluation of diagnostic assays. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 37, 1057–1063.
- Petterino, C., Castagnaro, M., Zappulli, V., Terregino, C. 2003a. Esame dell'apparato muscolo-scheletrico, in: *Manuale di tecnica delle autopsie e di diagnostica anatomo-patologica veterinaria*. Editrice estense Giraldi, 109–117.
- Petterino, C., Castagnaro, M., Zappulli, V., Terregino, C. 2003b. Esame della cavità addominale., in: *Manuale di tecnica delle autopsie e di diagnostica anatomo-*

- patologica veterinaria. Editrice estense Giraldi, 56–56.
- Petterino, C., Castagnaro, M., Zappulli, V., Terregino, C. 2003c. Esame della cavità toracica, in: Manuale di tecnica delle autopsie e di diagnostica anatomopatologica veterinaria. Editrice estense Giraldi, 91–107.
- Posthaus, H.; Kittl, S.; Tarek, B.; Bruggisser, J. 2020. Clostridium perfringens type C necrotic enteritis in pigs: diagnosis, pathogenesis, and prevention. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 32, 203–212.
- Ramamoorthy, S., Opriessnig, T., Pal, N., Huang, F.F., Meng, X.J., 2011. Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. *Veterinary Microbiology* 147, 49–58.
- Ramirez, A., Karriker, L.A., 2019. Herd Evaluation, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 1–16.
- Ruggeri, J., Salogni, C., Giovannini, S., Vitale, N., Boniotti, M.B., Corradi, A., Pozzi, P., Pasquali, P., Alborali, G.L., 2020. Association Between Infectious Agents and Lesions in Post-Weaned Piglets and Fattening Heavy Pigs With Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). *Frontiers in Veterinary Science* 7, 636.
- Ruiz, A., 2017. Immunohistochemistry: A Rapid and Specific Diagnostic Tool for Influenza Virus Infection in Pigs. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research* 5, 212–214.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C.A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary Research* 51, 1–19.
- Saporiti, V., Valls, L., Maldonado, J., Perez, M., Correa-Fiz, F., Segalés, J., Sibila, M., 2021. Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases. *Viruses* 13, 264.
- Sarli, G., D’Annunzio, G., Gobbo, F., Benazzi, C., & Ostanello, F., 2021. The role of pathology in the diagnosis of swine respiratory disease. *Veterinary Sciences* 8, 256.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research* 164, 10–9.

- Segalés, J., Martínez, J., Castellà, J., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E., Martín, M., Sibila, M. 2013. Laboratory diagnosis of enteric disorders, in: Handbook of laboratory diagnosis in swine. Servet editorial – Grupo Asis Biomedia, 64-73.
- Segalés, J., Sibila, M., 2022. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Veterinary sciences* 9, 110.
- Temeeyasen, G., Lierman, S., Arruda, B.L., Main, R., Vannucci, F., Gimenez-Lirola, L.G., Piñeyro, P.E., 2020. Pathogenicity and immune response against porcine circovirus type 3 infection in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *Journal of General Virology* 102.
- Ticó, G., Segalés, J., Martínez, J., 2013. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Veterinary Microbiology* 163, 242–247.
- Torrison, J., Cameron, R., 2019. Integumentary System, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 292–312.
- Trang, N.T., Hirai, T., Yamamoto, T., Matsuda, M., Okumura, N., Giang, N.T.H., Lan, N.T., Yamaguchi, R., 2014. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid from naturally infected pigs in a breeding herd. *Journal of Veterinary Science* 15, 361–367.
- Uzal, F.A., Plattner, B.L., Hostetter, J.M. 2016. The alimentary system, in: Jubb, Kennedy, and Palmer's *Pathology of Domestic Animals*, Volume 2. Elsevier, 1-257.
- VanderWaal, K., Deen, J., 2018. Global trends in infectious diseases of swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 11495–11500.
- Vandeveld, M., Higgins, R., Oevermann, A. 2012. General neuropathology, in: *Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice*, John Wiley & Sons Inc, 1-37.
- Vincent, L.L., Janke, B.H., Paul, P.S., Halbur, P.G., 1997. A Monoclonal-Antibody-Based Immunohistochemical Method for the Detection of Swine Influenza Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 191–195.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M.,

- Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 11, 530–532.
- Woods, G.L., Walker, D.H., 1996. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical microbiology reviews* 9, 382–404.
- Yaeger, M.J., 2002. The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 15–19.
- Yaeger, M.J., Alstine, W.G., 2019. Respiratory System, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 393–407.
- Zhang, Q., Bai, J., Hou, H., Song, Z., Zhao, Y., Jiang, P., 2017. A novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus with significant variation in cell adaption and pathogenicity. *Veterinary Microbiology* 208, 150–158.
- Zimmerman, J.J., Dee, S.A., Holtkamp, D.J., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G.W., Torremorell, M., Yang, H., Zhang, J., 2019. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses), in: *Diseases of Swine*. Wiley, 685–708.

## **CONTRIBUTO SPERIMENTALE**

# CAPITOLO 2. Il Complesso delle Malattie Respiratorie del suino (PRDC): Ruolo patologico del PCV2 e del PRRSV in una casistica italiana di PRDC

---

## 2.1 Introduzione

La definizione *Porcine Respiratory Disease Complex* (PRDC) è utilizzata per indicare l'insieme delle diverse forme che la patologia respiratoria, annoverata tra le principali cause di diminuzione delle produzioni nell'industria suinicola mondiale, può assumere nel moderno allevamento intensivo del suino (Opriessnig et al., 2011).

La PRDC è una patologia multifattoriale causata dall'interazione tra diversi patogeni virali e batterici ed influenzata da co-fattori stressanti ambientali, manageriali e ospite-specifici. La PRDC è di fatto una patologia dall'eziologia polimicrobica (Choi et al., 2003; Fablet et al., 2012) in cui gli agenti coinvolti possono fungere da patogeni primari o secondari (Tabella 5).

Tabella 5. Patogeni primari e secondari nella *Porcine respiratory disease complex* (PRDC) (Sarli et al., 2021).

Patogeni primari	Patogeni secondari
PRRSV	<i>Mycoplasma</i> spp
SIV	Streptococchi
PRCV	Staphylococchi
PCV2	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Klebsiella
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Haemophilus parasuis</i> ( <i>Glasserella parasuis</i> )
	<i>Pasteurella multocida</i>

La maggior parte degli agenti microbici associati alla PRDC sono considerati ubiquitari e spesso causa di infezioni di natura endemica; per questo motivo molti dei patogeni primari coinvolti, sebbene siano in grado di determinare malattia, da soli causano forme cliniche lievi e transitorie. Le forme più gravi invece dipendono tipicamente dalla co-infezione con patogeni di irruzione secondaria: il meccanismo patogenetico prevede che agenti primari agiscano determinando un danno diretto ai meccanismi di difesa aspecifici dell'ospite predisponendolo all'azione di patogeni secondari, spesso batteri residenti nel nasofaringe, che esacerbano il danno e la gravità delle lesioni (Yaeger and Alstine, 2019).

La natura polimicrobica della PRDC comporta un ostacolo nella diagnosi e nel determinare quali virus o batteri siano i responsabili del problema respiratorio osservato in allevamento. In generale, le epidemie virali tendono a presentarsi, se non complicate, come focolai ad elevata morbilità, insorgenza improvvisa e di breve durata, mentre le infezioni batteriche, primarie o secondarie, tendono a diffondersi più lentamente attraverso un gruppo di suini (Janke, 1995). La diagnosi su base clinica è limitata anche dal fatto che potenzialmente la malattia dovuta al virus è offuscata dall'effetto di infezioni batteriche concomitanti o secondarie, e che i segni clinici sono spesso condivisi tra diversi virus che colpiscono il sistema respiratorio con differenze che possono essere sottili, non costantemente presenti o meno evidenti rispetto all'effetto di infezioni batteriche secondarie (Janke, 1995).

La complessità delle suddette interazioni tra patogeni rende dunque difficile lo studio della PRDC, la prevenzione ed il controllo della malattia (Opriessnig et al., 2011), nonché l'identificazione dell'agente eziologico responsabile dell'episodio di patologia respiratoria (Sunaga et al., 2020).

A causa della natura endemica ed ubiquitaria della maggior parte dei patogeni coinvolti nella patologia respiratoria del suino, non sempre l'isolamento/identificazione dell'agente comporta che questo sia direttamente coinvolto nello sviluppo della malattia e/o associato alle lesioni presenti. La PRDC è caratterizzata da una significativa sovrapposizione nella presentazione clinica e patologica delle lesioni, e l'identificazione degli agenti causali richiede quindi l'integrazione delle informazioni macroscopiche con le analisi di laboratorio e con le evidenze microscopiche (Yaeger and Alstine, 2019).

In caso di sospetto PRDC può essere utilizzata un'ampia gamma di test diagnostici diretti o indiretti. La rapida diagnosi con metodi molecolari consente l'individuazione di un patogeno durante l'infezione, mentre i test sierologici sono un approccio appropriato per il monitoraggio nel tempo delle infezioni in un allevamento (Giles et al., 2017); altri approcci promettenti sono i test dei fluidi orali (*oral fluids* – OF) e di altri campioni non convenzionali, come gli emosieri testicolari (*processing fluids* – PF) (Hernandez-Garcia et al., 2017). Saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), test di immunofluorescenza indiretta (IFA) e immunoperossidasi (IPMA) sono frequentemente utilizzati per rilevare la presenza di anticorpi specifici contro alcuni agenti infettivi (Christopher-Hennings et al., 2019; Lin et al., 2011). Per l'individuazione della maggior parte dei patogeni batterici la coltura batterica è il metodo diagnostico più comune, anche se non il più rapido; tuttavia ha il vantaggio di consentire la valutazione della suscettibilità antimicrobica dei batteri isolati (Christopher-Hennings et al., 2019). L'isolamento virale può essere utilizzato per far crescere e identificare i virus dai campioni clinici, ma richiede campioni freschi e necessita tempistiche lunghe di esecuzione, fino a due o più settimane per ottenere i risultati. Per

questi motivi, la diagnosi diretta delle infezioni virali viene attualmente eseguita con metodi molecolari come la reazione a catena della polimerasi (PCR), la PCR quantitativa (qPCR) o la PCR *multiplex* (Christopher-Hennings et al., 2019; Hernandez-Garcia et al., 2017; Trang et al., 2018, 2014). A causa della sua natura polimicrobica, la rapida identificazione degli agenti eziologici nella PRDC è complicata dall'assenza di un singolo test diagnostico utilizzato di *routine* per la rilevazione dei principali patogeni ad essa associati (Lung et al., 2017). Pertanto, nel tempo, sono stati sviluppati e testati sistemi di rilevamento *multiplex* PCR o PCR *real-time* per la rilevazione simultanea dei numerosi patogeni associati a malattie respiratorie nei suini (Lung et al., 2017; Sunaga et al., 2020). Il sequenziamento di prima o seconda generazione (NGS) integra i risultati della PCR, confermando ulteriormente l'identificazione del patogeno di interesse, potendolo caratterizzare anche a livello di ceppo (Christopher-Hennings et al., 2019).

Sebbene la PCR sia un metodo sensibile, questo non permette di discriminare l'infezione dalla malattia e il rilevamento di un agente infettivo non lo rende necessariamente la causa della malattia osservata (Maes et al., 2014). La possibilità di co-localizzare l'agente eziologico con le rispettive lesioni caratteristiche grazie all'impiego di tecniche immunoistochimiche (IHC) permette di oggettivare il ruolo svolto dal patogeno nel determinismo della malattia. In questo contesto, le lesioni polmonari registrate al macello o in corso di necropsia, integrate da indagini istologiche, devono essere considerate come potenti strumenti per assegnare il giusto ruolo agli agenti eziologici individuati (Sarli et al., 2021).

L'infezione da PCV2 è stata associata a forme respiratorie di malattia e a lesioni polmonari interstiziali di tipo istiocitario/granulomatoso fin dai primi anni della sua scoperta come agente causale della sindrome da deperimento progressivo post-

svezzamento (PMWS) (Harms et al., 2002; Kim et al., 2004; Ségalés et al., 2004), in particolare nelle forme di polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) in associazione ad altri agenti virali (Ellis et al., 2004; Grau-Roma and Segalés, 2007; Morandi et al., 2010). Pertanto la forma respiratoria è stata annoverata tra le *Porcine circovirus diseases* (PCVD) con la nomenclatura di *PCV2-associated respiratory disease* (Opriessnig et al., 2007) o *PCV2 lung disease* (PCV2-LD) secondo Segalés, (2012) (Tabella 6).

Tabella 6. Nomenclatura delle malattie associate all'infezione da circovirus suino di tipo 2. Confronto della letteratura secondo Opriessnig et al., 2007 e Segalés, 2012.

Diseases	Porcine circovirus diseases – PCVD Segalés, 2012	Porcine circovirus associated diseases – PCVAD Opriessnig et al., 2007
Subclinical infection	PCV2 subclinical infection «PCV2-SI»	PCV2-subclinical infection
Posweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)	PCV2 systemic diseases «PCV2-SD»	PCV2-systemic infection
Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)	PCV2-PDNS	PCV2-PDNS
Reproductive failure	PCV2 reproductive disease «PCV2-RD»	PCV2-reproductive failure
PRDC – PNP	PCV2 lung disease «PCV2-LD»	PCV2-associated respiratory disease
Necrotizing lymphadenitis	Necrotizing lymphadenitis	Necrotizing lymphadenitis
Granulomatous enteritis	PCV2 enteric disease «PCV2-ED»	PCV2-enteritis

Tuttavia, sussiste una potenziale sovrapposizione tra la forma esclusivamente respiratoria e la forma sistemica da PCV2, definita come *PCV2 systemic disease* (PCV2-SD) (Segalés, 2012), poiché la sintomatologia respiratoria può essere presente anche nelle forme sistemiche di infezione. Il coinvolgimento di PCV2 nella PRDC comporta uno scenario diagnostico complesso che oltre alla valutazione clinica necessita di conferme di laboratorio per discriminare tra forme esclusivamente respiratorie o sistemiche da

circovirus. Tradizionalmente, il PCV2-LD viene diagnosticato quando (1) sono presenti segni clinici come *distress* respiratorio o dispnea, (2) si osservano lesioni polmonari microscopiche costituite da polmonite interstiziale linfo-istiocitaria o granulomatosa o bronco-interstiziale, fibroplasia peribronchiolare, lieve bronchiolite necrotizzante e ulcerativa o polmonite proliferativa e necrotizzante, tutte osservate in assenza di lesioni linfoidi (queste ultime caratteristiche della forma sistemica cioè la PCV2-SD) e (3) è rilevata una quantità da moderata a elevata di PCV2 nel polmone (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012). La differenziazione tra le due forme avviene dunque sulla base dei reperti istopatologici e l'esame non solo del polmone, ma anche dei diversi distretti linfoidi (Segalés, 2012).

Sebbene nel tempo il PCV2 si sia riconfermato come importante patogeno coinvolto nella PRDC (Fablet et al 2012; Hansen et al 2010; Paz-Sánchez et al 2021; Wellenberg et al., 2010), si ritiene che il fenomeno di PCV2-LD sia in realtà un'entità trascurabile in allevamento e che la maggior parte dei casi clinicamente diagnosticati come casi di PRDC associati a PCV2, con l'analisi concomitante dei tessuti linfoidi si configurino invece come forme di PCV2-SD caratterizzate quindi anche da deplezione linfocitaria nei distretti linfoidi dell'organismo (Segalés and Sibila, 2022; Ticó et al., 2013).

È noto che lo sviluppo di PCVD è favorito da co-infezioni di natura virale o batterica che sperimentalmente consentono di riprodurre in maniera più efficiente la malattia, e che sono altresì di frequente riscontro anche in condizioni di campo associate a forme cliniche e a lesioni più gravi (Opriessnig and Halbur, 2012; Ouyang et al., 2019). In particolare, nelle forme cliniche respiratorie è molto comune con elevate prevalenze la co-infezione PCV2/PRRSV (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014). Il PRRSV

è l'agente eziologico della sindrome riproduttiva respiratoria del suino (PRRS), malattia tra le più devastanti del settore suinicolo e la cui infezione si manifesta con sintomatologia prevalentemente respiratoria nei suinetti svezzati e nei magroni e con forme di patologia riproduttiva nelle scrofe gravide (Halbur et al., 1995; Johnson et al., 2004; Lunney et al., 2016; Meredith, 1992; Wagner et al., 2011). Il PRRSV è di fatto annoverato tra i patogeni virali primari della PRDC. Insieme al PCV2 i due virus sono responsabili principalmente di un'azione immunosoppressiva sulle cellule del sistema immunitario che determina un'alterazione delle difese dell'ospite predisponendolo a infezioni secondarie batteriche e virali (Chase and Lunney, 2019; Loving et al., 2015; Lunney et al., 2016; Niederwerder et al., 2016). L'interazione tra i due agenti patogeni nel potenziare le manifestazioni cliniche di malattia evidenzia l'importanza della diagnosi accurata e del controllo dei due virus nell'allevamento suinicolo.

Lo scopo del lavoro che qui viene presentato è stato di indagare il ruolo del PCV2 in casi di PRDC in suini provenienti da diversi allevamenti del Nord Italia. Lo studio è stato condotto sul polmone ma anche su diversi distretti linfoidi dell'organismo per poter stimare quante delle forme respiratorie osservate potevano essere classificate come malattia respiratoria associata a PCV2 o essere viceversa riconducibili a quadri di infezione e malattia sistemica da PCV2. Sulla stessa casistica, è stata condotta l'indagine sul ruolo giocato dal PRRSV, nelle co-infezioni e non con PCV2, nelle forme di PRDC incluse nello studio.

## 2.2 Materiali e metodi

La casistica dello studio si compone di 79 suini con più di 4 settimane di età (svezzamento e ingrasso) provenienti da gruppi di animali con anamnesi riconducibile a PRDC da 22 diversi allevamenti del Nord Italia e deceduti a seguito di sintomatologia respiratoria o sacrificati ai fini delle indagini diagnostiche. Tutte le aziende incluse prevedevano misure di profilassi vaccinale nei confronti del PCV2 e 4 riportavano problemi legati a PRRSV in anamnesi. Tutti i suini sono stati sottoposti a necropsia diagnostica durante la quale sono stati prelevati e fissati in formalina campioni di tessuto per l'esame istopatologico, tra cui in particolare polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale come campionamento *standard* per le indagini relative alla ricerca dell'antigene PCV2 sui tessuti.

### 2.2.1 Istologia ed immunoistochimica

I tessuti fissati in formalina sono stati inclusi in blocchetti di paraffina da cui sono state ricavate sezioni di tessuto di 3 µm di spessore, successivamente colorate ai fini dell'esame istopatologico con ematossilina eosina (HE) come colorazione istologica di *routine*. Le sezioni dei diversi tessuti sono state quindi esaminate per la valutazione qualitativa delle lesioni microscopiche. Nel polmone le lesioni sono state classificate secondo i criteri di Caswell and Williams (2015) come: broncopolmonite, in caso di presenza di macrofagi e neutrofili in bronchi e bronchioli e negli spazi alveolari; polmonite interstiziale in caso di setti alveolari ispessiti da linfociti e macrofagi con eventuale iperplasia degli pneumociti di tipo II; polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) in caso di raccolta alveolare di macrofagi e detriti necrotici associati a iperplasia

degli pneumociti di tipo II e setti alveolari ispessiti dall'infiltrazione di cellule infiammatorie; polmonite pleurofibrinosa in caso di aree di necrosi nel parenchima polmonare con pleura, alveoli e bronchioli terminali riempiti da fibrina, liquido eosinofilo omogeneo (edema), granulociti neutrofili, meno macrofagi, leucociti necrotici e occasionali trombi vasali. Le lesioni sono state registrate come singole o combinate quando sono stati osservati rispettivamente uno o più tipi di lesione. Nei tessuti linfoidei le lesioni sono state classificate come noto (Valli et al., 2015) in iperplasia linfoide in caso di presenza di follicoli linfoidei secondari reattivi con centro germinativo prominente in buona parte del tessuto degli organi esaminati; deplezione linfoide in caso di follicoli linfoidei non rilevabili o con zone centrollicolari dei follicoli presenti infiltrate da istiociti. Il quadro istologico è stato considerato nella norma (NN) in caso di tessuto linfoide normotrofico ed assenza di iperplasia.

Parallelamente alla colorazione con HE, sezioni di 3 µm di spessore degli stessi tessuti esaminati (polmone, tonsilla, linfonodo tracheobronchiale e/o mediastinico, milza, ileo e linfonodo inguinale superficiale) e per l'indagine sul PRRSV solo il polmone, sono stati sottoposti ad esame immunohistochimico rispettivamente per PCV2 e PRRSV. I dettagli del protocollo immunohistochimico utilizzato, riguardanti smascheramento dei siti antigenici, diluizione d'uso degli anticorpi primari impiegati e sistema di rivelazione sono riportati in Tabella 7.

Come controlli positivi sono state impiegate sezioni di linfonodo e polmone precedentemente individuati come positivi per la presenza degli antigeni PCV2 e PRRSV.

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

Tabella 7. *Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi.*

Ab primario	Tipo, Clone	Ditta	Diluizione/ incubazione	Smascheramento siti antigenici	Sistema di rivelazione
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG <sub>2a</sub> Anti-VP2 PCV2	Ingenasa, Madrid, Spain	1:1500/ overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories
PRRSV	1AC7, Isotipo: IgG <sub>2a</sub> Specifico per proteina N	Ingenasa, Madrid, Spain	1:500 overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C	CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer - ScyTek Laboratories

Nel polmone, la prova IHC per PCV2 è stata considerata positiva in caso di colorazione granulare marrone del citoplasma dei macrofagi alveolari ma anche dei monociti, delle cellule epiteliali bronchiali, delle cellule endoteliali e delle cellule dendritiche centrollicolari nei tessuti linfoidi (Opriessnig et al., 2007; Segalés, 2012; Ticó et al., 2013). La prova per PRRSV è stata valutata positiva in caso di colorazione marrone nel citoplasma dei macrofagi alveolari, degli pneumociti di tipo II e nelle cellule epiteliali bronchiali (Grau-Roma and Segalés, 2007; Han et al., 2012; Zimmerman et al., 2019).

#### *Criteri diagnostici*

I quadri di polmonite associati alla positività nel polmone e/o nei tessuti linfoidi per PCV2 sono stati categorizzati come PCVD. Partendo dal presupposto che i soggetti inclusi nello studio erano tutti casi con sintomatologia respiratoria e diagnosi

clinica di PRDC, secondo gli attuali criteri diagnostici per la definizione di ciascun caso di PCVD (Segalés and Sibilia, 2022), i casi con polmoni positivi per l'antigene PCV2 e concomitante presenza di deplezione linfocitaria da moderata a grave nei tessuti linfoidi associata ad una quantità da moderata ad elevata del virus nei tessuti linfoidi è stata considerata indicativa di forma sistemica di malattia da PCV2 (PCV2-SD). I casi con polmoni e/o tessuti linfoidi PCV2+ con lesioni istopatologiche minime (iperplasia linfoide) o assenti nei tessuti linfoidi sono stati considerati come casi di PRDC con ruolo di PCV2 (PRDC/PCV2+), stante l'indicazione di non considerare più la PCV2-LD tra le PCVD (Segalés and Sibilia, 2022).

## **2.3 Risultati**

Nei 79 casi di PRDC esaminati la principale lesione polmonare osservata è risultata essere la polmonite interstiziale, con o senza evidenza concomitante di broncopolmonite. I valori percentuali delle lesioni polmonari sono rappresentati nel grafico a torta della classificazione delle lesioni (Figura 17). In particolare sono stati osservati: 44 casi (55,7%) di polmonite interstiziale pura (Figura 18A); 17 casi (21,5%) di broncopolmonite (Figura 18B) associata a polmonite interstiziale; 8 casi (10,1%) di polmonite proliferativa e necrotizzate (PNP) (Figura 18C-D); 2 casi (2,5%) di PNP associata a polmonite interstiziale e concomitante broncopolmonite essudativa; 2 casi (2,5%) di pleuropolmonite fibrinosa; 2 casi di broncopolmonite pura (2,5%); 1 caso di broncopolmonite con concomitante polmonite interstiziale e pleuropolmonite (1,3%); 2 casi con evidenza di sola congestione ed emorragie polmonari (2,5%); 1 caso di

broncopolmonite riconducibile macroscopicamente e microscopicamente a polmonite enzootica (1,3%).

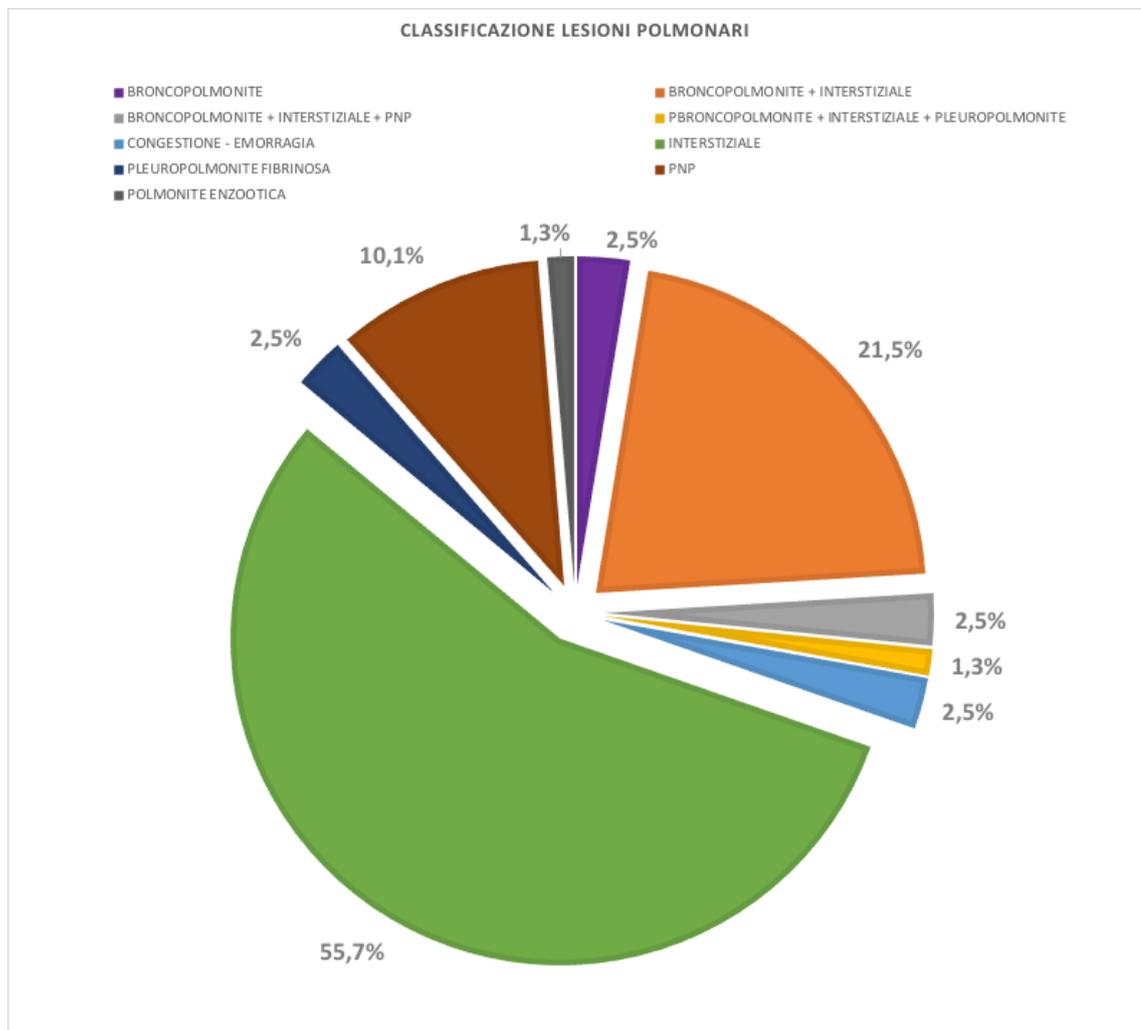


Figura 17. Grafico a torta della distribuzione percentuale delle lesioni polmonari osservate nei 79 casi di PRDC.

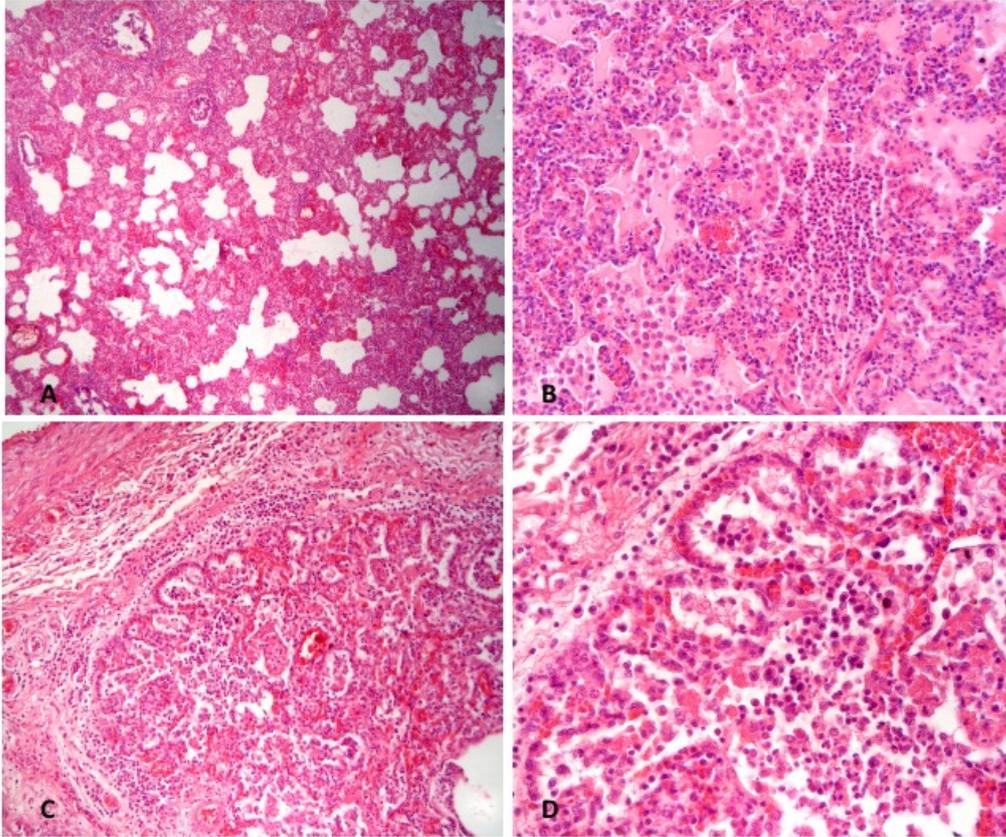


Figura 18. Lesioni polmonari, ematossilina eosina. A) polmonite interstiziale, caso 25057, 63x; B) Broncopolmonite essudativa: essudazione di neutrofili e macrofagi negli alveoli, caso 25058, 250x; C-D) Polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), caso 26104, 160x e 400x rispettivamente.

44/79 casi di PRDC sono risultati positivi alla prova IHC per PCV2 (nel polmone o in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati) (Figura 19) e 34/79 per PRRSV (Figura 20). Sul totale, nel 20,3% dei casi i polmoni erano doppi positivi all'IHC per PCV2 e PRRSV (Figura 21). La Tabella 8 sintetizza i risultati dell'IHC nel contesto di ciascuna lesione polmonare osservata nei casi in esame.

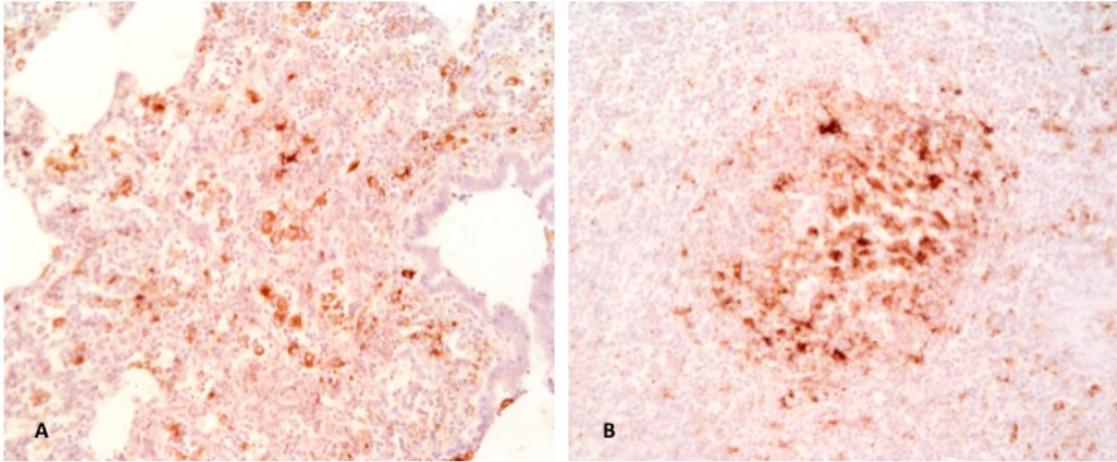


Figura 19. Prova immunoistochimica per PCV2. A) polmone, macrofagi dell'interstizio positivi per PCV2, caso 26766, 250x; B) linfonodo inguinale superficiale, positività centrollicolare per PCV2, caso 26767, 250x.

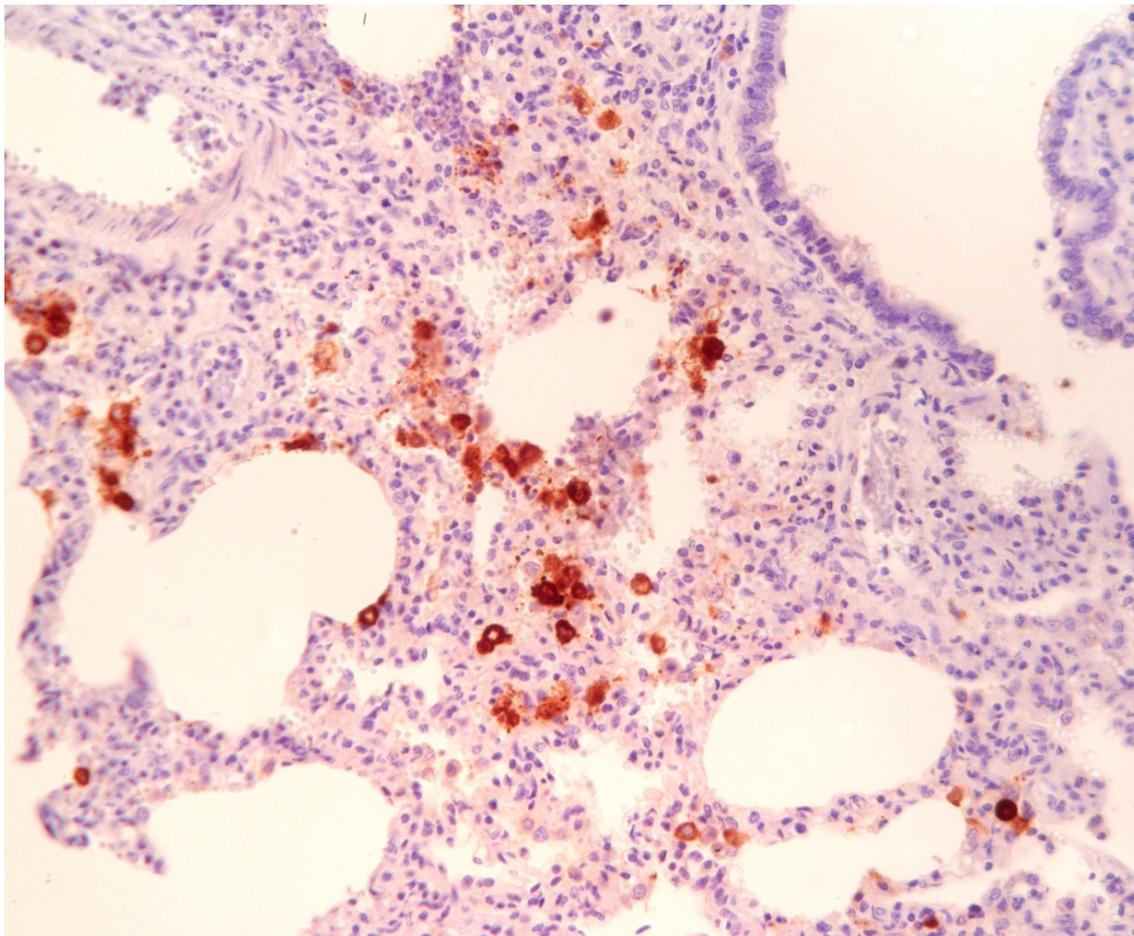


Figura 20. Prova immunoistochimica per PRRSV. Macrofagi alveolari e pneumociti di tipo II positivi per PRRSV, caso 26768, 250x.

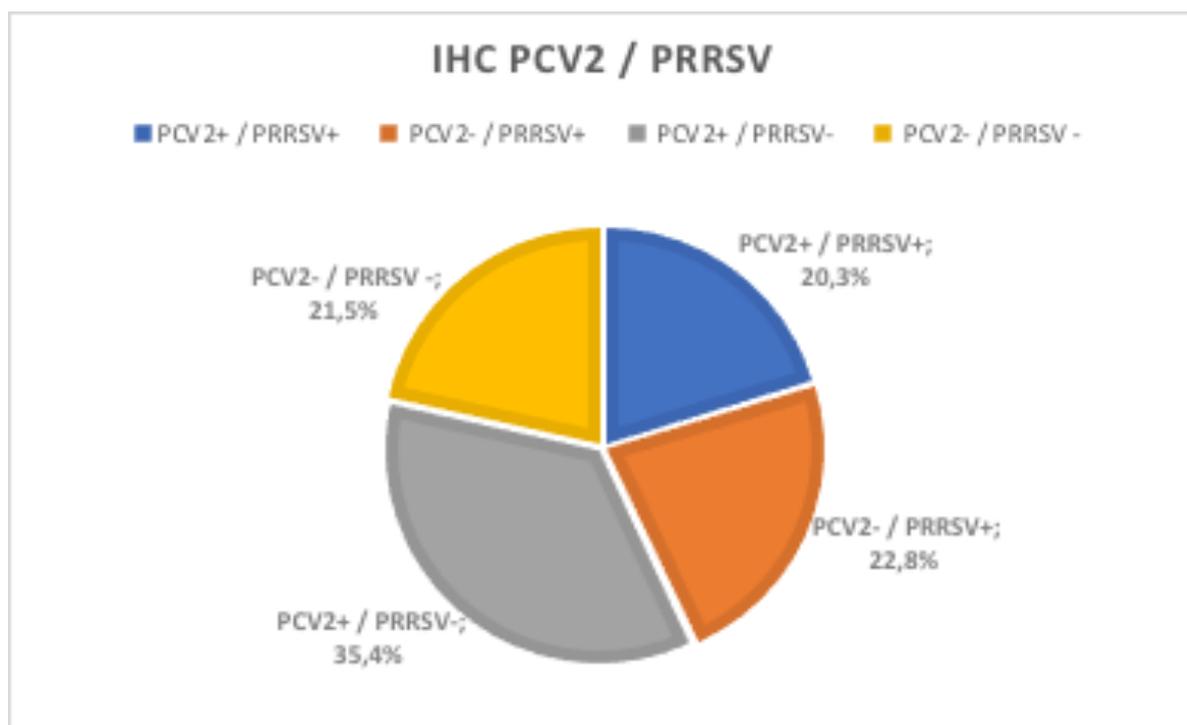


Figura 21. Grafico a torta della distribuzione percentuale dei risultati dell'immunoistochimica per PCV2 e PRRSV nei 79 casi di PRDC in esame.

Tabella 8. Sintesi dei risultati delle prove immunoistochimiche per PCV2 e PRRSV nel contesto delle lesioni polmonari osservate. \*BP, broncopolmonite; IP, polmonite interstiziale; PNP, polmonite proliferativa e necrotizzante; CE, congestione ed emorragia; FPP, pleuropolmonite fibrinosa; EP, polmonite enzootica.

Lesione	N°casi	IHC		
		PCV2+	PRRSV+	PCV2+ / PRRSV+
BP	1	1	2	1
BP + IP	17	6	3	0
BP + IP + PNP	2	0	2	0
BP + IP + PP	1	1	0	0
IP	44	28	17	11
CE	2	1	0	0
FPP	2	1	1	1
PNP	8	5	6	3

Nei casi con lesioni polmonari ascrivibili a PNP (10/79), 5/10 polmoni erano PCV2- PRRSV+; 2/10 PCV2+ PRRSV-; 3/10 sono risultati PCV2+ PRRSV+ (Figura 22).

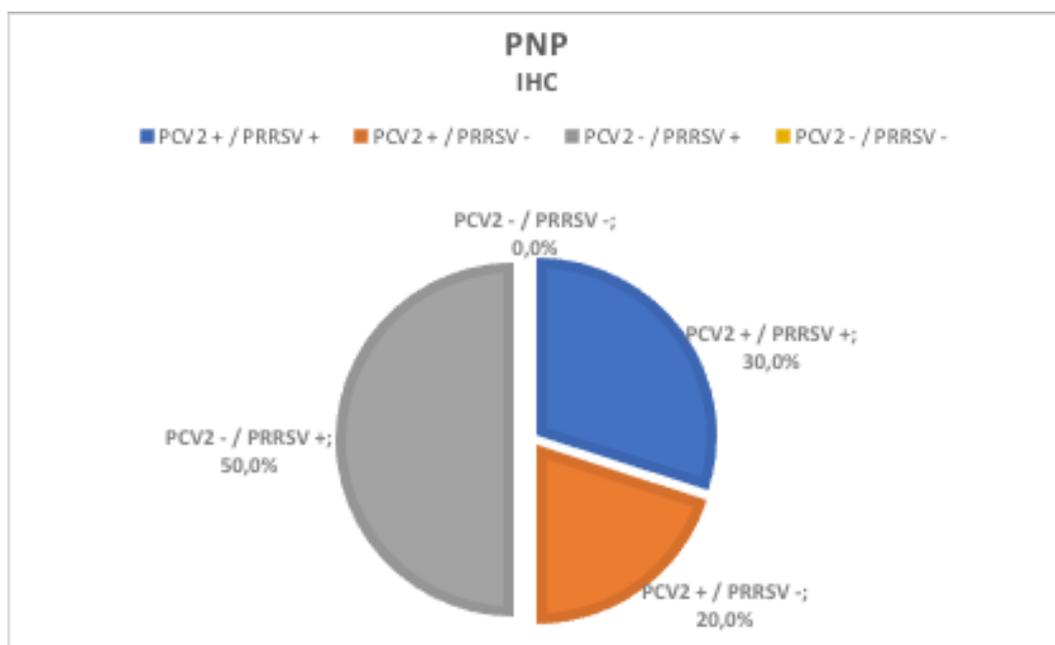


Figura 22. Grafico a torta della distribuzione percentuale dei risultati dell'immunoistochimica per PCV2 e PRRSV nei casi di polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP).

Nei 44 soggetti con tessuti linfoidei positivi all'IHC per PCV2, 28 mostravano lesioni ascrivibili a deplezione linfocitaria in almeno uno dei tessuti linfoidei esaminati e positività immunoistochimica per PCV2 in almeno uno dei tessuti linfoidei saggiati con IHC (Figura 23). Questi casi sono stati categorizzati come PCV2-SD (63,6%) (Figura 24). Nei casi rimanenti (16/44), oltre alle lesioni polmonari positive per PCV2 (13/16), si evidenziava un quadro di lieve/moderata iperplasia del tessuto linfoide o tessuti linfoidei normotrofici, associato o meno a lieve positività all'antigene di PCV2 nelle cellule dendritiche centrollicolari in almeno una delle stazioni linfoidei. Questi casi sono stati categorizzati come PRDC/PCV2+ (36,4%) (Figura 24).

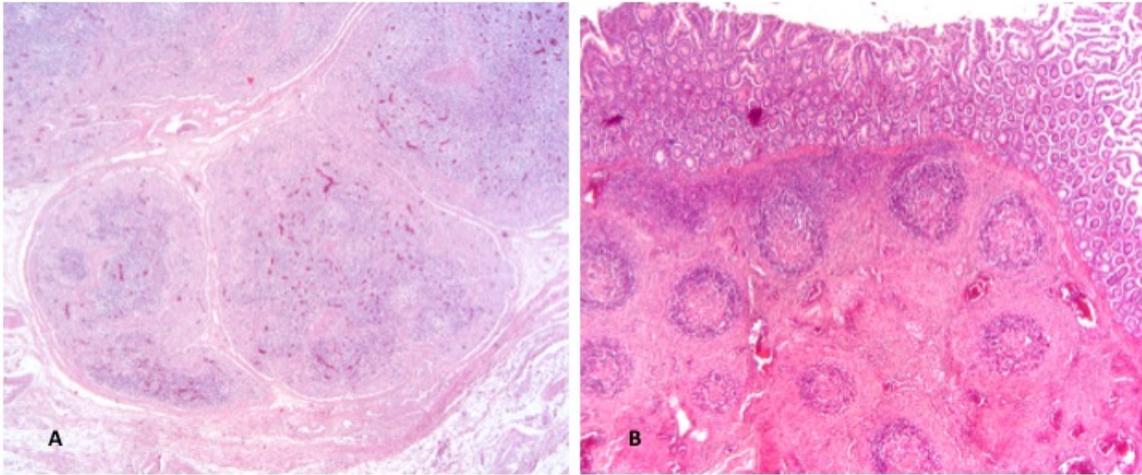


Figura 23. Lesioni nei tessuti linfoidei. A) Linfonodo, deplezione linfoide, caso 26105, 250x; B) Ileo, ileite granulomatosa: granulomi centrofollicolari, caso 26105, 250x.

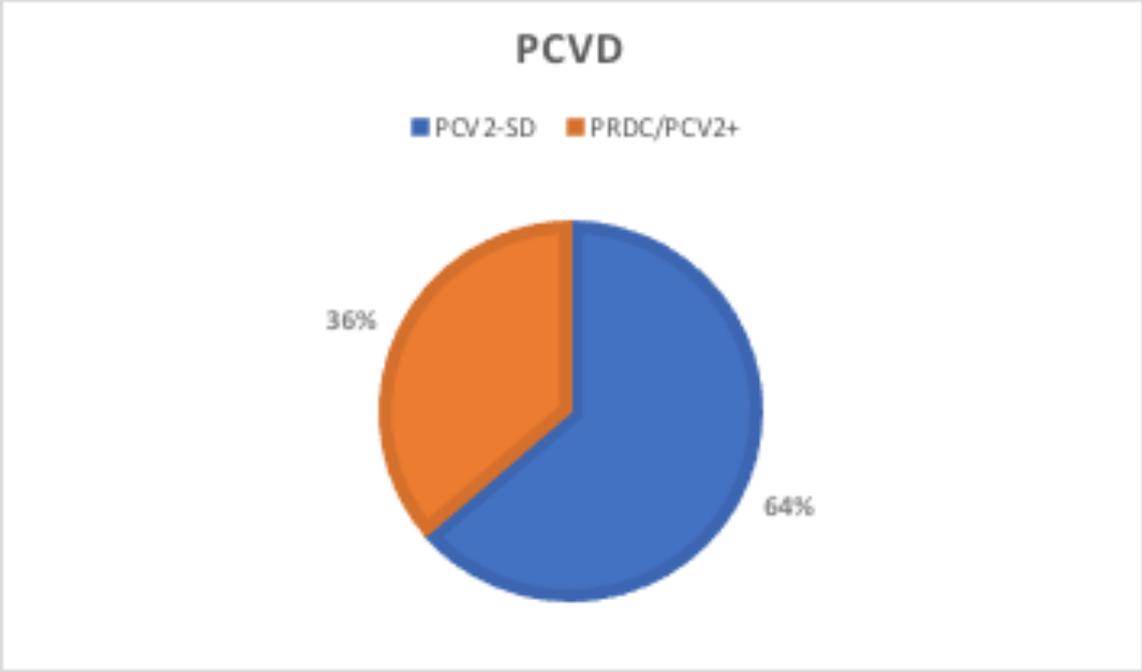


Figura 24. Grafico a torta del dato percentuale relativo alla definizione di caso di PCVD nei 38 casi PCV2+nei tessuti.

In Tabella 9 sono tabulati in dettaglio i risultati della valutazione delle lesioni polmonari e linfoidei, delle prove IHC per PCV2 e PRRSV, e dei singoli tessuti positivi a PCV2 per la definizione dei casi di PCVD.

Poiché le diagnosi di PCVD devono prevedere l'iter diagnostico condotto su un gruppo di 3-5 soggetti, i risultati relativi alla categorizzazione e definizione

dei singoli casi in PCV2-SD e PRDC/PCV2+ sono stati elaborati anche suddividendoli per azienda di provenienza in Figura 25.

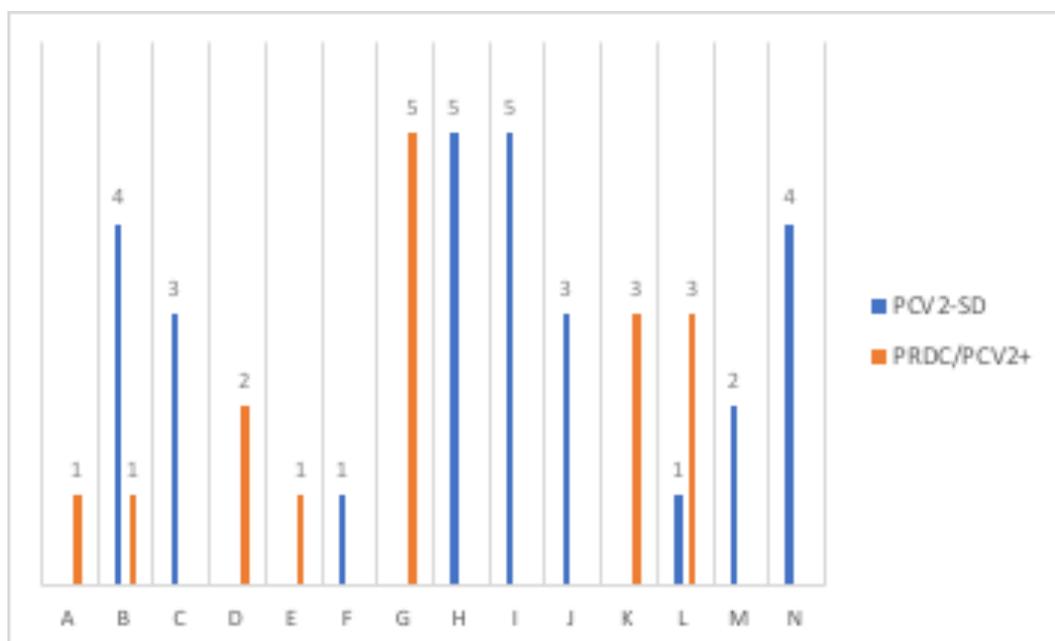


Figura 25. Elaborazione dei dati della categorizzazione dei singoli casi PCV2+ suddivisi per azienda di provenienza. A-N azienda di provenienza. In ogni azienda è indicato il numero di soggetti conferiti per l'iter diagnostico, categorizzati, in base ai risultati già riferiti, come portatori di PCV2-SD o di PRDC-PCV2+. Poiché la diagnosi finale è sul gruppo, nelle aziende B ed L la diagnosi finale sarà di PCV2-SD. Si rimanda alla discussione per maggiori dettagli.

Nei casi PCV2+, il 42,9% delle PCV2-SD (12/28) erano casi positivi anche alla prova IHC per PRRSV nel polmone; il 25% delle PRDC/PCV2+ erano doppi positivi per PCV2 e PRRSV (4/28) (Figura 26).

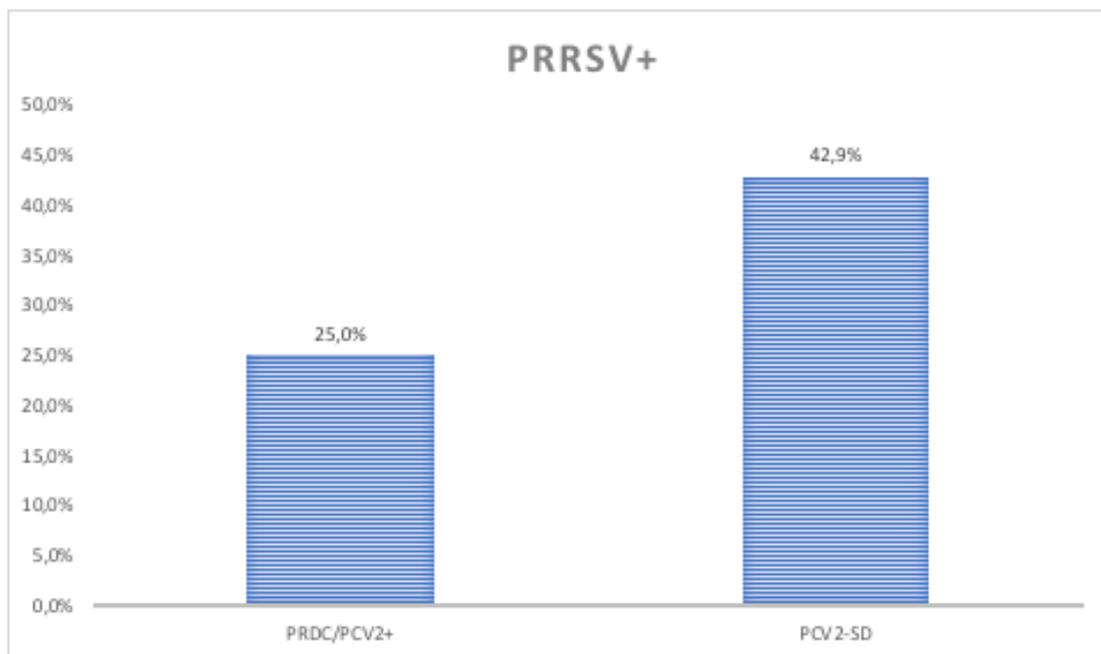


Figura 26. Valori percentuali di positività al PRRSV nel polmone nei casi di PCV2-SD e PRDC/PV2.

Tabella 9. Porcine Circovirus Disease (PCVD) in forme cliniche di PRDC. Risultati della valutazione delle lesioni istopatologiche ed immunoistochimiche in casi positivi a PCV2. \*BP, broncopolmonite; IP, polmonite interstiziale; PNP, polmonite proliferativa e necrotizzante; CE, congestione ed emorragia; FPP, pleuropolmonite fibrinosa; EP, polmonite enzootica; LHYP, iperplasia linfoide; LD, deplezione linfoide; P, positivo; N, negativo, 1\*, tessuto PCV2+; 1, tessuto esaminato, 0, tessuto non esaminato; LN M, linfonodo mesenterico; LN S, linfonodo sternale; PCV2-SD, malattia sistemica da PCV2; PRDC/PCV2+, forma respiratoria di PRDC con ruolo di PCV2.

ID	Azienda	Lesione polmonare	Lesione t. linfoidi	IHC PCV2	IHC PRRSV	Polmone	Ln Tracheobronchiale	Tonsilla	Ileo	Milza	Ln inguinale superficiale	Fegato	Altro	PCVD
22609	A	BP + IP	LHYP	P	N	1*	1*	1*	0	1*	0	0	0	PRDC/PCV2+
23193	B	IP	LD	P	P	1*	0	1*	0	1	1*	0	0	PCV2-SD
23194	B	BP	LD	P	P	1*	0	1*	0*	1	1*	0	0	PCV2-SD
23195	B	CE	LHYP	P	N	1	0	1*	0	1	1*	0	0	PRDC/PCV2+
23196	B	IP	LD	P	N	1*	0*	1*	1*	1	1*	0	0	PCV2-SD
23197	B	IP	LD	P	N	1*	0*	1*	1*	1	1*	0	0	PCV2-SD
23604	C	IP	LD	P	P	1	1*	1*	1	1	1	1	1	PCV2-SD
23605	C	IP	LD	P	P	1	1*	1*	1	1	1	1	0	PCV2-SD
23606	C	FPP	LD	P	P	1	1*	1*	1	0	1	1	0	PCV2-SD
23932	D	IP	LHYP	P	N	1*	1	1*	1*	1	1*	1	1* LN M	PRDC/PCV2+
23933	D	IP	LHYP	P	N	1*	1	1*	1	1*	1*	1	1* LN M	PRDC/PCV2+
24104	E	IP	LHYP	P	N	1*	1*	0	1	0	1*	0	1* LN M	PRDC/PCV2+
24273	F	BP + IP	LD	P	N	1	1	1*	1	0	1	0	1	PCV2-SD
24876	G	BP + IP	LHYP	P	N	1*	1*	0	0	0	1*	0	1* LN S	PRDC/PCV2+
24877	G	IP	LHYP	P	N	1*	1*	1	0	1	1*	0	0	PRDC/PCV2+
24878	G	BP + IP	LHYP	P	N	1*	0	1*	0	1	1*	0	0	PRDC/PCV2+
24879	G	BP + IP	LHYP	P	N	1	1	1*	0	0	1*	0	0	PRDC/PCV2+
24880	G	IP	LHYP	P	N	1	1*	1	0	1	1*	0	0	PRDC/PCV2+
24906	H	IP	LD	P	P	1	1*	1*	1	0	1*	0	1	PCV2-SD
24907	H	IP	LD	P	P	1*	1*	1*	1	1	1*	0	1	PCV2-SD
24911	H	IP	LD	P	P	1	1*	1*	0	0	1*	0	0	PCV2-SD
24912	H	PNP	LD	P	P	1*	1*	1*	1*	1	1*	0	0	PCV2-SD
24913	H	PNP	LD	P	N	1*	1*	1*	1	1	1*	1	1	PCV2-SD
25055	I	IP	LD	P	N	1*	1	1*	1*	1	1*	0	0	PCV2-SD
25056	I	BP + IP + PP	LD	P	N	1*	1	1	1	1	1	0	0	PCV2-SD
25057	I	IP	LD	P	N	1*	1	1*	1	1	1	0	0	PCV2-SD
25058	I	BP + IP	LD	P	N	1*	0	1*	1	1	1*	0	0	PCV2-SD
25059	I	IP	LD	P	N	1*	0	1*	1*	1	1	0	0	PCV2-SD
26462	J	IP	LD	P	N	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PCV2-SD
26463	J	IP	LD	P	N	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PCV2-SD
26464	J	IP	LD	P	N	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PCV2-SD
26486	K	IP	NN	P	P	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26487	K	IP	NN	P	N	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26488	K	IP	NN	P	N	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26765	L	IP	NN	P	P	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26766	L	IP	LD	P	P	1*	1*	1	0	0	0	0	0	PCV2-SD
26767	L	IP	NN	P	P	1*	1	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26768	L	IP	NN	P	P	1*	1	1	0	0	0	0	0	PRDC/PCV2+
26024	M	IP	LD	P	N	1	1*	1	1	0	1*	0	1* LN M	PCV2-SD
26025	M	IP	LD	P	N	1	1	1*	1	0	1	0	1 LN M	PCV2-SD
26104	N	PNP	LD	P	P	1*	1*	1*	1*	0	1*	0	0	PCV2-SD
26105	N	BP + IP	LD	P	N	1	1	1	1	0	1	0	0	PCV2-SD
26106	N	PNP	LD	P	P	1*	1*	1*	1*	0	1*	0	0	PCV2-SD
26108	N	PNP	LD	P	N	1*	1*	1*	1*	0	1	0	0	PCV2-SD

## 2.4 Discussione

La PRDC è una condizione clinica ad elevata morbilità che in allevamento si manifesta in suini sopra le quattro settimane d'età con sintomatologia respiratoria spesso non responsiva agli antibiotici e che sottende un ampio spettro di lesioni polmonari causate da microrganismi batterici e virali che agiscono in sinergia nel determinare e/o aggravare il danno polmonare.

In questo studio condotto dal punto di vista istologico su 79 casi di PRDC, il *pattern* microscopico di polmonite maggiormente osservato nei casi clinici di forme respiratorie in esame è stata la polmonite interstiziale (55,7%), seguita da forme miste in cui accanto alla lesione di polmonite interstiziale si osservavano aree di broncopolmonite essudativa (21,5%). Forme miste con multifocale essudazione di neutrofili negli alveoli erano associate anche a pleuropolmoniti e a casi di PNP. Nel suino il *pattern* interstiziale di polmonite è quello tipicamente correlato ad infezioni virali che raggiungono il polmone per via ematogena (es. PCV2, PRRSV), mentre l'essudazione di neutrofili e macrofagi nel comparto bronchiolo-alveolare è indice di complicazioni batteriche (Sarli et al., 2021). Le lesioni microscopiche polmonari osservate suggeriscono quindi un quadro dovuto principalmente a infezioni virali complicate da infezioni batteriche secondarie, compatibile con la definizione di PRDC (Loosli, 1968; Opriessnig et al., 2011). Sebbene non siano stati condotti esami microbiologici sui polmoni esaminati, le lesioni di pleuropolmonite e polmonite enzootica osservate in basse percentuali (2,5 e 1,3% rispettivamente) sono state considerate come indicative di infezione batterica (*A. pleuropneumoniae*; *M. hyopneumoniae*).

I risultati dell'IHC per PCV2 e PRRSV hanno confermato l'associazione dell'aspetto microscopico delle lesioni con la causa virale, rilevando la presenza degli antigeni dei due virus nella maggior parte dei casi in esame (Figura 21) associati alla polmonite interstiziale (Tabella 8). Sebbene si tratti di patogeni non strettamente respiratori, PCV2 e PRRSV si confermano quali virus fortemente coinvolti in forme cliniche respiratorie del suino (Opriessnig et al., 2011). Nel 20,3% dei casi l'IHC ha evidenziato la co-infezione PCV2/PRRSV in polmoni risultati doppi positivi PCV2+/PRRSV+. La co-infezione tra PCV2 e PRRSV è un fenomeno noto (Burgara-Estrella et al., 2012; Drolet et al., 2003; Fan et al., 2013; Harms et al., 2001; Zeng et al., 2014), così come è noto che l'infezione da PRRSV agisca come co-fattore in grado di aggravare le lesioni ed indurre le manifestazioni cliniche di PCVD (Harms et al., 2001; Park et al., 2014). In accordo con studi precedenti (Drolet et al., 2003; Morandi et al., 2010), i casi di PNP nel nostro studio erano associati soprattutto ad infezione con PRRSV e presenza dell'antigene virale nel contesto delle lesioni polmonari, con una buona percentuale di casi (30%) doppi positivi per PCV2 e PRRSV.

Nel nostro studio, pur essendo sempre presente il polmone quale organo *target* da studiare, poiché ci si riferiva ad animali con sintomatologia respiratoria, il campionamento ha previsto sempre anche la raccolta di altri organi, rappresentati da tessuti linfoidi, che sono considerati lo *standard* di riferimento per discriminare tra loro le diverse forme di PCVD. Ciò ha consentito, nei casi PCV2+ nel polmone, di concludere per PCV2-SD quando i soggetti presentavano lesioni e positività anche nei tessuti linfoidi, seppure la sintomatologia clinica fosse uguale per tutti e di stampo respiratorio. Infatti in 28/44 soggetti positivi al PCV2 (63,6%) è stata riscontrata deplezione linfoide in almeno uno dei tessuti linfoidi esaminati tra tonsilla, linfonodo

tracheobronchiale, linfonodo inguinale superficiale, milza e ileo, in aggiunta alle lesioni polmonari. I criteri diagnostici per la definizione di casi di malattia sistemica da PCV2 stabiliti fin dalle prime descrizioni di malattia associate al PCV2 (Segalés et al., 2005; Segalés, 2012) comprendono la triade composta da segni clinici, lesioni e *viral detection* nel contesto delle lesioni caratteristiche e sono a tutt'oggi valide quando l'approccio diagnostico comprende (1) la raccolta di campioni corretti per la diagnosi di ciascuna PCVD; (2) il momento clinico appropriato per la selezione degli animali (fasi acute/subacute di malattia) (Segalés and Sibila, 2022). Nella casistica in esame a fronte di una sintomatologia prevalentemente respiratoria in assenza di grave deperimento ed anemia (segni clinici tipicamente associati alla PCV2-SD), una più alta percentuale di casi era in realtà riconducibile a forme sistemiche di malattia da PCV2, dato in accordo con quanto osservato nello studio di Ticó et al., (2013) che non riconosce la "*lung disease*" come entità a sé stante ma la inquadra come parte di un più ampio quadro sistemico di infezione. L'epidemiologia del PCV2 ha subito modifiche sostanziali dall'avvento dell'uso dei vaccini (Segalés, 2015) e negli anni si è assistito ad una riduzione della gravità della presentazione della malattia, con l'aumento della prevalenza dei segni clinici aspecifici nelle categorie produttive colpite (Kristensen et al., 2015). Sebbene i vaccini-PCV2 siano tra i più efficaci impiegati in allevamento, sono comunque descritti casi di PCV2-SD nelle mandrie vaccinate (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014) potenzialmente associati alla circolazione di nuovi ceppi (Sibila et al., 2021) o causati da protocolli vaccinali inappropriati come vaccinazioni tardive o troppo precoci con interferenza con l'immunità di derivazione materna (Segalés and Sibila, 2022). Inoltre bisogna tenere presente che le forme di PCVD si manifestano a seguito

di infezione da PCV2 ma in concomitanza di fattori scatenanti tra cui co-infezioni batteriche o virali (Segalès et al., 2019). Il virus della PRRS è individuato come patogeno chiave coinvolto nelle co-infezioni nell'allevamento suinicolo (Saade et al., 2020; Zhao et al., 2021). In questo studio, 12/28 (42,9%) polmoni di soggetti con diagnosi finale di PCV2-SD erano contemporaneamente positivi per PRRSV (Figura 26). Diversi studi sperimentali hanno mostrato che le co-infezioni PCV2-PRRSV possono indurre segni clinici e lesioni più gravi rispetto alle infezioni dei singoli patogeni (Allan et al., 2000; Rovira et al., 2002). Le co-infezioni virali possono direttamente o indirettamente determinare una maggiore replicazione e virulenza dei virus coinvolti (Fan et al., 2013; Niederwerder et al., 2015; Niederwerder et al., 2016; Sinha et al., 2011) dovute nel caso di PRRSV e PCV2 al sinergismo dei due virus nella modulazione dell'immunità innata e adattativa dell'ospite (Dong et al., 2015; Richmond et al., 2015; Tu et al., 2015). Questo è vero anche nel caso della vaccinazione contro PRRSV in mandrie infette PCV2; è stato dimostrato infatti che la vaccinazione con vaccino vivo attenuato contro PRRSV migliora la replicazione del PCV2 ed aumenta la viremia lavorando in maniera identica ad una co-infezione PCV2/PRRSV (Park et al., 2013). Per il controllo delle forme cliniche in allevamento è dunque cruciale avere un'idea dello stato sanitario della mandria per la scelta della strategia vaccinale più adeguata (Chae, 2016).

La diagnosi di PCVD è una diagnosi di mandria (Segalés et al., 2019). Considerando la provenienza dei conferimenti ed elaborando i dati ottenuti per singola azienda positiva per PCV2 (14/22) (Figura 25), in 7 aziende (C, F, H, I, J, M, N) tutti i suini esaminati presentavano il quadro per la categorizzazione in PCV2-SD. In 5 (A, D, E, G, K), tutte le forme osservate erano riferibili a PRDC/PCV2+; infine in 2 aziende (B, L) nonostante la differenza di risultati tra singoli casi esaminati,

l'evidenza di forma sistemica di malattia su almeno un soggetto tra quelli esaminati del gruppo di conferimento depone per la conclusione diagnostica di PCV2-SD.

In questo studio i singoli casi di PRDC diversi da PCV2-SD ma con coinvolgimento del PCV2 (PRDC/PCV2+), erano quelli in cui non si osservavano le lesioni caratteristiche di deplezione linfocitaria nei tessuti linfoidi (16/44, 36,4%). Tuttavia tutti erano PCV2+ nel polmone e/o in almeno uno dei distretti linfoidi esaminati, in presenza di lesioni polmonari (fatta eccezione che in tre casi: 23195, 24879, 24880, in cui il polmone era PCV2-). Se in condizioni sperimentali è raro osservare lesioni polmonari microscopiche con la singola infezione PCV2 (Hoogland et al., 2006; Opriessnig et al., 2006), in condizioni di campo numerosi co-fattori, infettivi e non, possono concorrere a potenziare il danno polmonare. Alla luce della correlazione positiva tra carica virale PCV2 nel siero e nei tessuti (Grau-Roma et al., 2009) si presume che in soggetti infetti anche in maniera subclinica ed in assenza di deplezione linfoide, il virus partecipi nel determinismo del PRDC.

Anche quando non è diagnosticata la forma sistemica di malattia da PCV2 ma si ha l'evidenza di circolazione virale e di presenza dell'antigene nei tessuti, in ogni caso il virus impatta sulla sanità della mandria. Nella nostra casistica il PCV2 è risultato associato in alta percentuale a sintomatologia respiratoria anche in assenza di forma sistemica di malattia. In questi casi, quando è possibile escludere una causa batterica specifica per lo sviluppo di PRDC, l'evidenza di infezione da PCV2 deve costituire un campanello d'allarme per la situazione sanitaria in azienda e guidare il miglioramento delle strategie di controllo e profilassi in allevamento.

## 2.5 Conclusioni

Nei casi di PRDC esaminati in questo studio è emerso che il PCV2 gioca un ruolo a vario titolo, potendone rilevare l'antigene nel polmone in associazione a lesioni microscopiche di polmonite interstiziale. In molti casi, forme cliniche di patologia respiratoria sottendono lesioni non solo polmonari ma anche di deplezione linfoide in diversi distretti linfoidi dell'organismo associate alla presenza dell'antigene PCV2, cosa che permette di indirizzare la diagnosi verso la forma sistemica di PCVD (PCV2-SD). Per evitare di sottostimare il danno indotto dal PCV2 in allevamento è quindi necessario condurre un campionamento appropriato per differenziare la forma sistemica di malattia che viceversa in assenza di altri segni tipici potrebbe non essere correttamente individuata. Sebbene sia superata la definizione di PCV2-LD (Segalés and Sibila, 2022), il PCV2 rimane tra i principali patogeni legati alla PRDC, insieme al PRRSV, impattando sulla sanità della mandria. In campo le co-infezioni possono aggravare il quadro patologico, imponendone il controllo scegliendo le misure più appropriate sulla base delle evidenze patologiche ed analitiche.

## Bibliografía

- Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of virology* 145, 2421–2429.
- Burgara-Estrella, A., Montalvo-Corral, M., Bolaños, A., Ramírez-Mendoza, H., Valenzuela, O., Hernández, J., 2012. Naturally co-infected boars with both porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Transboundary and emerging diseases* 59, 532–538.
- Caswell, J. L., Williams, K.J., 2015. Respiratory System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2, Elsevier. 465-591.
- Chae C., 2016. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary journal* 212, 1–6.
- Chase, C. & Lunney, J. K., 2019. Immune System. In: *Diseases of Swine*, Wiley, 264–291.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Canadian Veterinary Journal* 44, 735–737.
- Christopher-Hennings, J., Erickson, G.A., Hesse, R.A., Nelson, E.A., Rossow, S., Scaria, J., Slavic, D., 2019. Diagnostic Tests, Test Performance, and Considerations for Interpretation, in: *Diseases of Swine*. Wiley, 75–97.
- Dong, V. H., Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chiou, M. T., Lin, C. N., Chung, W. B., 2015. Expression of Toll-like receptor signaling-related genes in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Research in veterinary science* 101, 180–186.
- Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R., 2003. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2,

- and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Veterinary pathology* 40, 143–148.
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G. M., 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary microbiology* 98, 159-163.
- Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Veterinary Microbiology* 157, 152–163.
- Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., Liu, C., 2013. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virology journal* 10, 265.
- Giles, T.A., Belkhiri, A., Barrow, P.A., Foster, N., 2017. Molecular approaches to the diagnosis and monitoring of production diseases in pigs. *Research in Veterinary Science* 114, 266–272.
- Grau-Roma, L., & Segalés, J., 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Veterinary microbiology* 119(2-4), 144–151.
- Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, W., Fraile, L., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary microbiology* 135, 272-282.
- Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L. E., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary microbiology* 135, 272–282.
- Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A., 1995. Comparison of the pathogenicity of two

- US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary pathology* 32, 648–660.
- Han, K., Seo, H. W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Kang, S. H., Kim, S. H., Lee, B. H., Kwon, B., Chae, C., 2012. Evaluation of monoclonal antibody-based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24, 719–724.
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., Nielsen, O. L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of comparative pathology* 143, 120–131.
- Harms, P. A., Halbur, P. G., Sorden, S. D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production* 10, 27-30.
- Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., Paul, P. S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary pathology* 38, 528–539.
- Hernandez-Garcia, J., Robben, N., Magnée, D., Eley, T., Dennis, I., Kayes, S.M., Thomson, J.R., Tucker, A.W., 2017. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Management* 3, 7.
- Hoogland, M. J., Opriessnig, T., Halbur, P. G., 2006. Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Journal of swine Health and Production* 14, 133–139.
- Janke, B.H., 1995. Diagnosis of viral respiratory disease in swine. *Journal of swine Health and Production* 3, 116–120.
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C. R., Murtaugh, M. P., 2004. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 102, 233–247.

- Kim, J., Chung, H. K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 166, 251–256.
- Kristensen, C. S., Hjulsgaard, C. K., & Larsen, L. E., 2015. A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free. *Porcine health management* 1, 5.
- Lin, K., Wang, C., Murtaugh, M.P., Ramamoorthy, S., 2011. Multiplex method for simultaneous serological detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Journal of clinical microbiology* 49, 3184–90.
- Loosli, C.G., 1968. Synergism between respiratory viruses and bacteria. *The Yale journal of biology and medicine* 40, 522–540.
- Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., Zuckermann, F. A., 2015. Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 167, 1–14.
- Lung, O., Ohene-Adjei, S., Buchanan, C., Joseph, T., King, R., Erickson, A., Detmer, S., Ambagala, A., 2017. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 834–848.
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G. J., 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual review of animal biosciences* 4, 129–154.
- Maes, R.K., Langohr, I.M., Wise, A.G., Smedley, R.C., Thaiwong, T., Kiupel, M., 2014. Beyond H&E. *Veterinary Pathology* 51, 238–256.
- Meredith, M. J., 1992. Review of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Pig Disease And Information Centre*.
- Morandi, F., Ostanello, F., Fusaro, L., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V., 2010. Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *Journal of comparative pathology* 142, 74–78.
- Niederwerder, M. C., Bawa, B., Serão, N. V., Tribble, B. R., Kerrigan, M. A., Lunney, J. K., Dekkers, J. C., Rowland, R. R., 2015. Vaccination with a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Virus Vaccine Followed by Challenge with PRRS Virus and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)

- Protects against PRRS but Enhances PCV2 Replication and Pathogenesis Compared to Results for Nonvaccinated Cochallenged Controls. *Clinical and vaccine immunology* 22, 1244–1254.
- Niederwerder, M. C., Jaing, C. J., Thissen, J. B., Cino-Ozuna, A. G., McLoughlin, K. S., Rowland, R. R., 2016. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary microbiology* 188, 1–11.
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 133–148.
- Opriessnig, T., Halbur, P. G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus research* 164, 20–32.
- Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yu, S., Thacker, E. L., Fenaux, M., Meng, X. J., 2006. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Veterinary record* 158, 149-154.
- Opriessnig, T., Meng, X. J., Halbur, P. G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19, 591–615.
- Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., Halbur, P. G., 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Veterinary microbiology* 163, 177–183.
- Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L., 2019. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses* 11, 185.
- Park, C., Oh, Y., Seo, H. W., Han, K., Chae, C., 2013. Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clinical and vaccine immunology* 20, 369–376.
- Park, C., Seo, H. W., Park, S. J., Han, K., Chae, C., 2014. Comparison of porcine

- circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 95, 2486–2494.
- Paz-Sánchez, Y., Herráez, P., Quesada-Canales, Ó., Poveda, C. G., Díaz-Delgado, J., Quintana-Montesdeoca, M. D. P., Plamenova Stefanova, E., Andrada, M. 2021. Assessment of Lung Disease in Finishing Pigs at Slaughter: Pulmonary Lesions and Implications on Productivity Parameters. *Animals* 11, 3604.
- Richmond, O., Cecere, T. E., Erdogan, E., Meng, X. J., Piñeyro, P., Subramaniam, S., Todd, S. M., LeRoith, T., 2015. The PD-L1/CD86 ratio is increased in dendritic cells co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and the PD-L1/PD-1 axis is associated with anergy, apoptosis, and the induction of regulatory T-cells in porcine lymphocytes. *Veterinary microbiology* 180, 223–229.
- Rovira, A., Balasch, M., Segalés, J., García, L., Plana-Durán, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *Journal of virology* 76, 3232–3239.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C. A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary research* 51, 80.
- Sarli, G., D'Annunzio, G., Gobbo, F., Benazzi, C., Ostanello, F., 2021. The role of pathology in the diagnosis of swine respiratory disease. *Veterinary Sciences* 8, 256.
- Segalés J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research* 164, 10–19.
- Segalés J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert review of vaccines* 14, 473–487.
- Segalés, J., & Sibila, M., 2022. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Veterinary sciences* 9, 110.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews* 6, 119-142.

- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2019. Circoviruses. In *Diseases of Swine*, Wiley 473–487.
- Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary microbiology* 98, 137–149.
- Seo, H. W., Park, C., Kang, I., Choi, K., Jeong, J., Park, S. J., Chae, C., 2014. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of virology* 159, 3107–3111.
- Sibila, M., Rocco, C., Franzo, G., Huerta, E., Domingo, M., Núñez, J. I., Segalés, J., 2021. Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV-2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. *Pathogens* 10, 1016.
- Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Veterinary microbiology* 152, 235–246.
- Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T., 2020. Development of a one-run real-time pcr detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *Journal of Veterinary Medical Science* 82, 217–223.
- Ticó, G., Segalés, J., Martínez, J., 2013. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Veterinary microbiology* 163, 242–247.
- Trang, N.T., Hirai, T., Yamamoto, T., Matsuda, M., Okumura, N., Giang, N.T.H., Lan, N.T., Yamaguchi, R., 2014. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid from naturally infected pigs in a breeding herd. *Journal of Veterinary Science* 15, 361–367.
- Trang, N.T., Ngan, P.H., Hop, N. Van, Hirai, T., 2018. Nasal Swab – a New Tool for the Detection of Porcine Respiratory Disease Complex in Natural Infected Pigs. *Acta Scientific Microbiology* 1, 2–5.

- Tu, P. Y., Tsai, P. C., Lin, Y. H., Liu, P. C., Chang, H. L., Kuo, T. Y., Chung, W. B., 2015. Expression profile of Toll-like receptor mRNA in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Research in veterinary science* 98, 134–141.
- Valli, V. E. O. (Ted), Kiupel, M., Bienzle, D., (with Wood, R. D.), 2015. Hematopoietic System, in: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 3. Elsevier, 102-2068.
- Wagner, J., Kneucker, A., Liebler-Tenorio, E., Fachinger, V., Glaser, M., Pesch, S., Murtaugh, M. P., Reinhold, P., 2011. Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary journal* 187, 310–319.
- Wellenberg, G. J., Bouwkamp, F. T., Wolf, P. J., Swart, W. A., Mombarg, M. J., & de Gee, A. L., 2010. A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Veterinary microbiology* 142, 217–224.
- Yaeger, M.J., Alstine, W.G., 2019. Respiratory System, in: Diseases of Swine. Wiley, 393–407.
- Zeng, Z., Liu, Z., Wang, W., Tang, D., Liang, H., Liu, Z., 2014. Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine. *Journal of virological methods* 208, 102–106.
- Zhao, D., Yang, B., Yuan, X., Shen, C., Zhang, D., Shi, X., Zhang, T., Cui, H., Yang, J., Chen, X., Hao, Y., Zheng, H., Zhang, K., Liu, X., 2021. Advanced Research in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection With Other Pathogens in Swine. *Frontiers in veterinary science* 8, 699561.
- Zimmerman, J. J., Dee, S. A., Holtkamp, D. J., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Stevenson, G. W., Torremorell, M., Yang, H., Zhang, J., 2019. Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (porcine arteriviruses). In: Diseases of swine. Wiley, 685–708.

## CAPITOLO 3. L'enterite proliferativa da *Lawsonia intracellularis* nel suino

---

### 3.1 Introduzione

L'enteropatia proliferativa del suino (*proliferative enteropathy* - PE) è una patologia tipica della fase del magronaggio riconosciuta come causa di consistenti perdite economiche per l'allevamento suinicolo, soprattutto dovute alla riduzione dell'IPMG e dell'indice di conversione dell'alimento nonché all'aumento della mortalità e del numero dei soggetti di scarto (Arnold et al., 2019).

Il microrganismo responsabile, *Lawsonia intracellularis*, è un batterio intracellulare obbligato, Gram-negativo, non sporigeno, microaerofilo (McOrist et al., 1995a), localizzato, *in vivo*, nel citoplasma apicale delle cellule epiteliali delle cripte intestinali.

Sebbene non siano chiaramente individuati i fattori di virulenza responsabili dell'ingresso di *L. intracellularis* negli enterociti, in corso di prove sperimentali *in vitro* è stato descritto il processo di internalizzazione del batterio, che prevede una sua stretta adesione alla superficie cellulare, seguita da entrata attraverso vacuoli prodotti dalla invaginazione della membrana cellulare ed infine il rilascio del patogeno nel citoplasma delle cellule infette (McOrist et al., 1995b). La replicazione intracellulare di *L. intracellularis* è direttamente associata alla proliferazione degli enterociti (McOrist et al., 1996), tuttavia non sono ancora del tutto chiari i meccanismi mediante i quali *L. intracellularis* sia in

grado di determinare tale proliferazione. Mediante la caratterizzazione del profilo di espressione genica di enterociti infetti da *L. intracellularis* è emerso che gli enterociti proliferanti mostrano una significativa attivazione della trascrizione del DNA, della biosintesi proteica e dei geni Rho che agiscono sulla fase G1 del ciclo cellulare (Vannucci et al., 2013), la cui attivazione è già conosciuta nell'oncogenesi e nella promozione della proliferazione cellulare.

Come risultato della proliferazione incontrollata degli enterociti, in particolare delle cellule delle cripte intestinali, la manifestazione patologica della malattia è rappresentata dall'ispessimento della mucosa intestinale accompagnata dall'inibizione, ad opera di *L. intracellularis*, della maturazione e della differenziazione delle cellule caliciformi secretorie e delle cellule assorbenti. La conseguenza inevitabile è la riduzione dell'assorbimento dei nutrienti e la perdita di aminoacidi e proteine nel lume intestinale, condizioni prodromiche allo sviluppo di diarrea (Vannucci et al., 2010).

La PE può manifestarsi con forme cliniche diverse (Figura 27), che rispecchiano le diverse lesioni anatomopatologiche corrispondenti osservate. Clinicamente la PE può manifestarsi come sindrome enterica acuta (nella forma di enteropatia proliferativa emorragica, *proliferative hemorrhagic enteropathy* – PHE) o cronica (adenomatosi intestinale, *porcine intestinal adenomatosis* – PIA), fino a prevedere forme subcliniche di infezione (Lawson and Gebhart, 2000; Vannucci and Gebhart, 2019), che sono le più frequenti nonché 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 scarto (Karuppannan and Opriessnig, 2018).

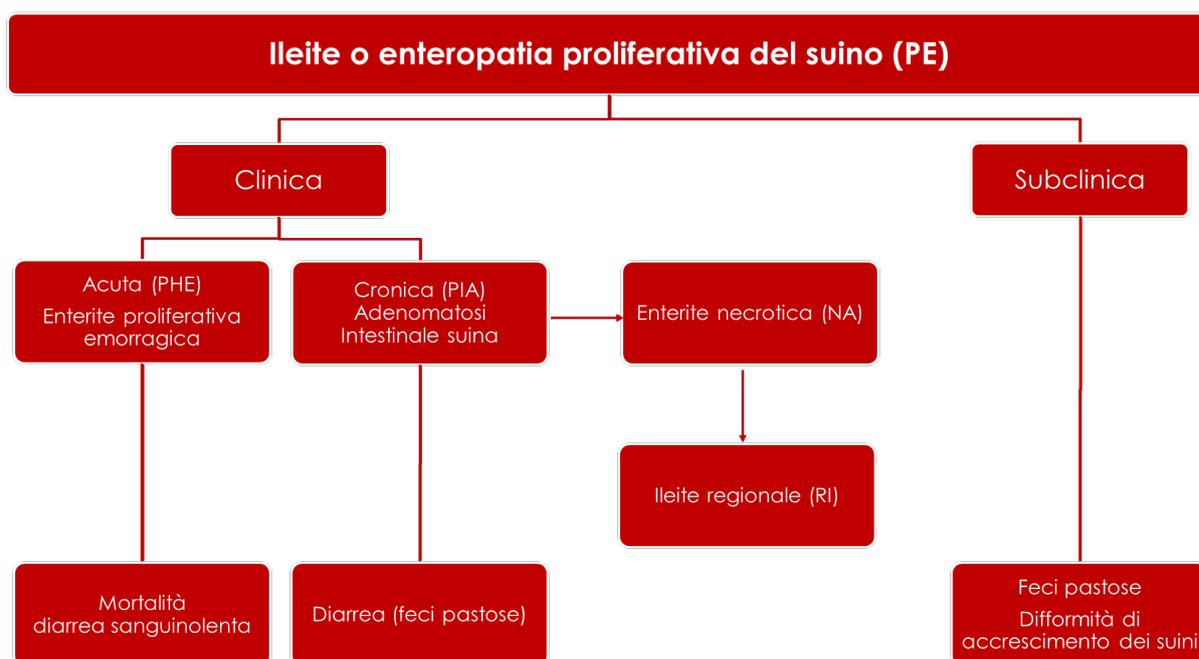


Figura 27. Classificazione delle forme cliniche e subcliniche di enterite proliferativa del suino (D'Annunzio et al., 2021).

Sono state descritte inoltre forme cliniche a bassa incidenza quali l'enterite necrotica (*necrotic enteritis* – NE) e l'ileite regionale (*regional ileitis* – RE), rispettivamente frutto di una forma di enterite proliferativa cronica complicata da infezioni secondarie e del processo di guarigione conseguente. Nel primo caso, la principale lesione osservata è la necrosi coagulativa dell'epitelio intestinale; nel secondo caso, la guarigione della lesione intestinale di tipo necrotizzante è caratterizzata da deposizione di tessuto di granulazione ed ispessimento della tonaca muscolare (Lawson and Gebhart, 2000; Vannucci and Gebhart, 2019).

Il sospetto clinico di PE può essere confermato con l'osservazione, all'esame *post-mortem*, delle lesioni macroscopiche caratteristiche della malattia associate a quelle rilevate microscopicamente. La lesione macroscopica tipica della PE è l'ispessimento della mucosa intestinale dovuta alla marcata proliferazione delle cellule delle cripte intestinali. Nei suini in

accrescimento affetti dalla forma cronica di adenomatosi intestinale (PIA), le lesioni si osservano principalmente a carico della porzione terminale dell'ileo, lungo i 10 cm a monte della valvola ileo-ciecale, e a livello di cieco. Nei casi gravi di malattia, le lesioni possono coinvolgere anche il digiuno e il colon spirale. Indipendentemente dalla localizzazione, la mucosa si presenta ispessita e arricciata in pieghe longitudinali e trasversali, assumendo il tipico aspetto cosiddetto "cerebroide" (Figura 28A). Nei casi complicati da infezioni secondarie che esitano in forme di enterite necrotica (NE), all'ispessimento della mucosa si associa la presenza di membrane fibrino-necrotiche sulla superficie della mucosa intestinale che possono staccarsi ed essere rinvenute libere nell'intestino o nelle feci diarroiche (Figura 28C).

Nella forma acuta emorragica (PHE), si osservano dilatazione intestinale e ispessimento della parete causato dalla presenza di edema e dalla proliferazione della mucosa. Il lume dell'ileo può contenere uno o più coaguli frammisti a detriti fibrino-necrotici; nel retto si possono osservare feci dall'aspetto catramoso contenenti sangue misto ad alimento indigerito (Vannucci and Gebhart, 2019) (Figura 28B).

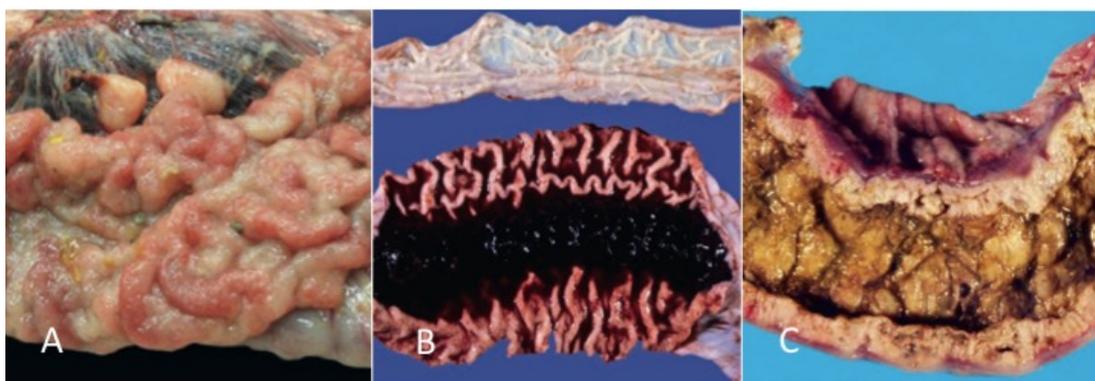


Figura 28. Ileo: lesioni macroscopiche attribuibili alle diverse forme di enteropatia proliferativa del suino. A) adenomatosi intestinale; B) enteropatia proliferativa emorragica; C) enterite necrotica (Immagini da: Uzal et al., 2016).

A livello microscopico, le lesioni istologiche comuni a tutte le forme di PE sono la proliferazione adenomatosa dell'epitelio delle cripte del piccolo intestino e delle

ghiandole nella mucosa del grosso intestino. Le cripte intestinali si presentano iperplastiche, con epitelio costituito da enterociti immaturi e cellule disposte su più piani a formare un epitelio pseudostratificato al posto di quello tipico monostratificato colonnare. Le cellule caliciformi possono essere rare o del tutto assenti (D'Annunzio et al., 2021) (Figura 29).

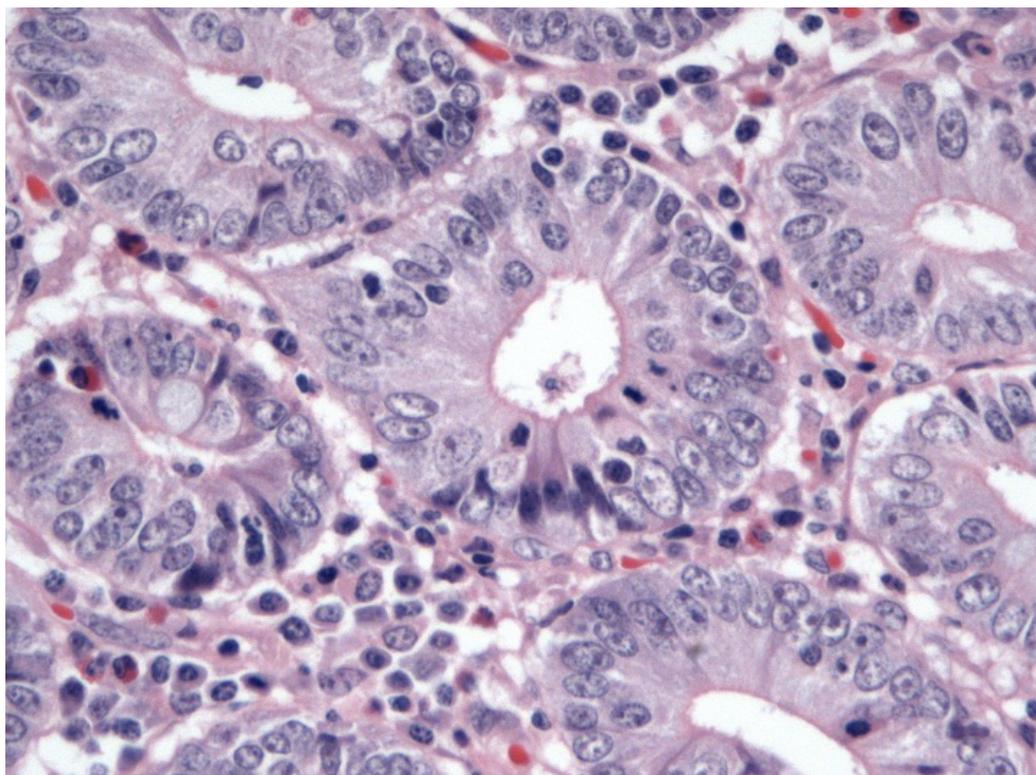


Figura 29. Cripte iperplastiche del piccolo intestino in corso di enteropatia proliferativa da *Lawsonia intracellularis*: cellule epiteliali delle cripte disposte su più piani a formare un epitelio pseudostratificato. Ematossilina eosina, 400x (D'Annunzio et al., 2021).

La diagnosi di infezione e malattia da *L. intracellularis* ad oggi costituisce ancora una sfida per i veterinari e per gli allevatori di suini per molteplici fattori. In diagnostica, le metodiche dirette (PCR qualitativa e quantitativa - qPCR, PCR *multiplex*, immunocistochimica – IHC) ed indirette (ELISPOT, ELISA, IFA, IPMA) impiegate per rilevare l'infezione da *L. intracellularis* sono svariate, ciascuna efficace singolarmente a partire da un dato tempo post-infezione, a seconda che siano basate sulla ricerca del patogeno (genoma o antigene) o sulla sierologia

(Campillo et al., 2021). Tuttavia manca una strategia comune convalidata di rilevazione dell'infezione con diagnosi significativa di malattia da *L. intracellularis*. Oltre al problema dell'identificazione delle forme subcliniche, anche quando i segni clinici sono evidenti la diagnosi di PE può essere complicata poiché questi non sono considerati patognomonici ma si tratta di presentazioni cliniche comuni ad altri agenti patogeni (ad es. *Brachyspira hyodysenteriae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e PCV2) (Baró et al., 2015; Suh and Song, 2005). La diagnosi è ostacolata dalla tipologia di eliminazione del patogeno nell'ambiente, poiché lo *shedding* può essere di tipo intermittente. Infine l'elevata prevalenza di *L. intracellularis* in allevamento è alla base del frequente errore di considerazione per cui il semplice rilevamento dell'infezione viene considerato conclusivo per determinare la causa della malattia clinica.

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 efficaci (Thomson and Friendship, 2019).

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 PCV2 (Thomson and Friendship, 2019). La compromissione delle difese immunitarie innate e adattative, che caratterizza l'infezione da PCV2 (Darwich and Mateu, 2012), 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 IgA (Shi et al., 2020). 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* (Järveots et al., 2016; Jensen et al., 2006; Opriessnig et al., 2011; Takada-Iwao et al., 2011).

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 malattia (Jensen et al., 2006).

Alla luce di ciò in questo studio è stato definito un percorso diagnostico per l'enterite da *L. intracellularis* con lo scopo di migliorare l'accuratezza diagnostica nell'enterite proliferativa del suino, valutando la concordanza tra test diagnostici nel confronto dei risultati ottenuti dalle indagini anatomo-patologiche ed istopatologiche con quelli dei test biomolecolari disponibili per i casi in esame effettuati dai laboratori degli IZZSS competenti per territorio. Ci si è prefissati inoltre 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*.

### 3.2 Materiali e metodi

I campioni di tessuto esaminati nello 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*, *B. 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 39 campioni di ileo di cui 4 provenienti da casi clinici di enteropatia proliferativa emorragica (PHE) (2/4) e di enterite necrotica (2/4), 24 campionati in allevamento da suini con sintomatologia diarroica indicativa di infezione da *L. intracellularis* e/o scarso accrescimento e 11 casi sospetti di forma subclinica campionati al macello.

### 3.2.1 Istologia ed 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 µm 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 per *L. intracellularis* e PCV2. I dettagli del protocollo immunoistochimico utilizzato, riguardanti smascheramento dei siti antigenici e diluizione d'uso degli anticorpi primari impiegati sono riportati in Tabella 10. 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 10. Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi.

Ab primario	Tipo, Clone	Ditta	Diluizione/ incubazione	Smascheramento siti antigenici
<i>L. intracellularis</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i> Supernatant of A18B1 (Boesen et al., 2005)	DTU-VET	1:200/ overnight 4°C	-
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG2a 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 (Opriessnig et al., 2011). 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) (Opriessnig et al., 2011).

La reazione immunoistochimica 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* (Jensen et al., 2006; Johansen et al., 2013). 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) (Opriessnig et al., 2011, 2004).

### 3.2.2 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 sono stati esaminati per la ricerca di PRRSV e PCV2 con PCR quantitativa.

## 3.3 Risultati

I risultati del *grading* delle lesioni istologiche e delle prove immunohistochimiche per *L. intracellularis* sono riportati in Tabella 11, 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).

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 immunohistochimica

per *L. intracellularis* è stata dimostrata in tutti i 4 campioni di ileo conferiti con indicazione di caso clinico di enteropatia proliferativa emorragica (Figura 30), e/o enterite necrotica. 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 31A).

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 32).



*Figura 30. 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.*

Tabella 11. Risultati del grading delle lesioni istologiche e delle prove immunoistochimiche per *L. intracellularis* e PCV2. C, caso clinico; A, caso campionato in allevamento; M, caso campionato al macello; IHC, immunoistochimica, -, non determinabile.

Score clinico	num. campione	infiltrato infiammatorio	iperplasia delle cripte	IHC <i>L. intracellularis</i>	IHC PCV2
C	AP20427	3	3	1	2
C	AP24700	3	2	3	0
C	AP26170	3	3	3	0
C	AP27171	3	3	1	0
A	AP21360	3	3	1	0
A	AP23254	3	3	2	1
A	AP23255	3	3	1	1
A	AP23559	3	3	1	0
A	AP25007	3	3	1	0
A	AP25008	3	3	1	0
A	AP20814	0	1	0	0
A	AP20815	2	2	0	0
A	AP20854	2	1	0	0
A	AP20524	3	3	0	0
A	AP23560	3	3	0	0
A	AP24531	3	2	0	0
A	AP24532	3	2	0	0
A	AP24771	1	2	0	0
A	AP24772	1	1	0	0
A	AP25380	3	1	0	0
A	AP25453	3	2	0	0
A	AP26169	2	2	2	0
A	AP26497	1	1	3	0
A	AP26579	2	2	1	0
A	AP26580	2	2	1	0
A	AP26581	2	2	1	0
A	AP26582	2	2	1	0
A	AP27172	1	1	0	0
M	83/22	3	3	0	0
M	84/22	3	2	0	0
M	85/22	3	3	0	0
M	86/22	3	3	0	0
M	87/22	3	3	1	0
M	88/22	3	3	1	0
M	89/22	3	3	1	0
M	90/22	3	3	1	0
M	91/22	3	3	0	0
M	92/22	3	3	0	0
M	93/22	3	3	0	0

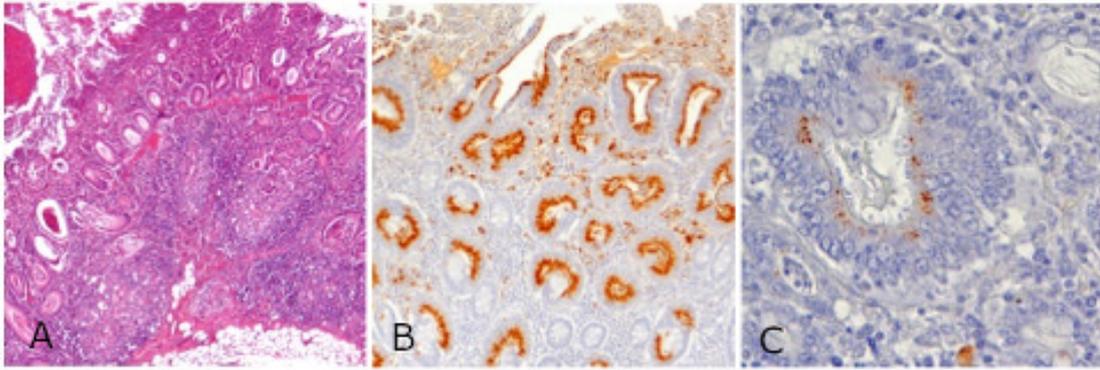


Figura 31. A) iperplasia di grado 3 con erniazione delle cripte intestinali nella sottomucosa; EE, 40x. B) positività di grado 3 per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali; IHC, 100x; C) dettaglio della positività per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali iperplastiche; IHC, 400x. EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

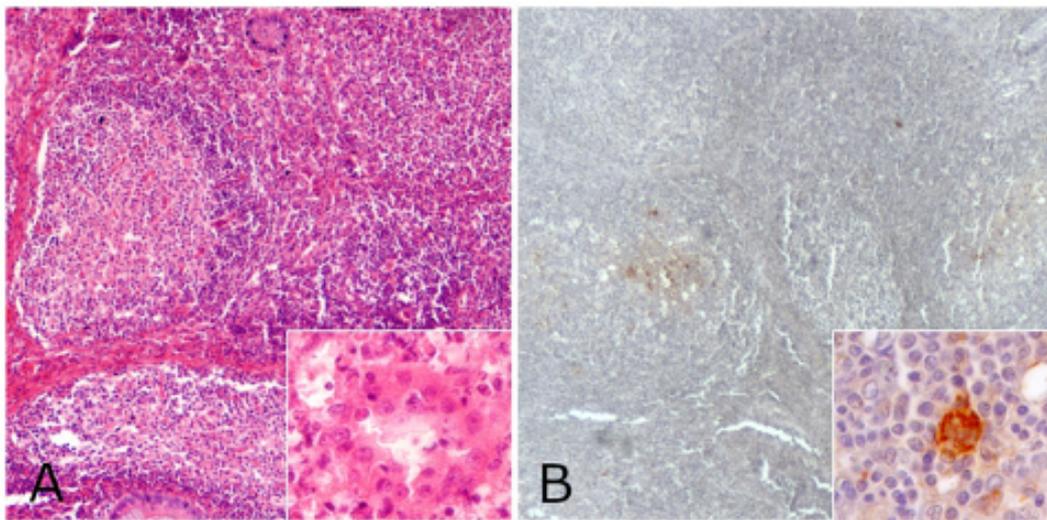


Figura 32. A) Deplezione linfoide di grado 2, con sostituzione del centro dei follicoli da parte di cellule istiocitarie; EE, 100x; inserto: dettaglio della presenza di istiociti al centro dei follicoli. B) positività centrofollicolare per PCV2, grado 2; IHC, 40x; inserto: dettaglio di positività citoplasmatica al PCV2 in una cellula centrofollicolare. EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

L'iperplasia delle cripte ed il grado di infiltrazione di cellule infiammatorie nella mucosa sono risultati 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* 12 dei 24 (50%) 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 delle placche del Peyer 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 74,36% (95%CI: 50,6-85,3%) (Tabella 12). In particolare, considerando l'istologia come *gold standard*, dei 29 campioni positivi alla PCR, 20 sono stati confermati all'IHC; 7 dei rimanenti 10 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 12. Accordo osservato dei risultati IHC e PCR. Nota: Accordo osservato= (a)+(d)/n= 20+9/39=74,36%

		IHC		
		+	-	
PCR	+	20 (a)	10 (b)	30
	-	0 (c)	9 (d)	9
		20	19	39 (n)

### 3.4 Discussione

L'osservazione della lesione macroscopica caratteristica della malattia da *L. intracellularis*, rappresentata dall'ispessimento e sollevamento in pieghe della mucosa dell'ileo, permette di confermare il sospetto clinico e di avanzare l'ipotesi diagnostica di una delle diverse forme di PE: la forma acuta emorragica (PHE), la forma cronica di adenomatosi intestinale (PIA) o di enterite necrotica (NE) (Lawson and Gebhart, 2000; Vannucci and Gebhart, 2019). La diagnosi di enteropatia proliferativa è confermata in presenza delle lesioni microscopiche tipiche dell'infezione da *L. intracellularis* associate ad una prova IHC positiva, tecnica che permette di condurre la diagnosi eziologica. L'IHC rappresenta il test che garantisce maggiore sensibilità e specificità per la diagnosi *post-mortem* di PE (Campillo et al., 2021) ed è considerata la metodica *gold standard*, potendo mettere in evidenza la presenza dell'antigene di *L. intracellularis* nel contesto delle lesioni microscopiche caratteristiche, rappresentate dall'iperplasia delle cripte intestinali.

Mediante esame istologico, l'iperplasia delle cripte intestinali è stata osservata in tutti i casi sospetti di PE. Mediante IHC, la positività per l'antigene è stata dimostrata in 20 delle 39 sezioni di ileo esaminate. Sono risultati positivi all'IHC i 4 campioni provenienti dai 4 casi clinici, 4 degli 11 campioni prelevati al macello e 12 dei 24

campioni provenienti da allevamenti che presentava casi di diarrea e/o sospetto di forma subclinica di PE.

Nel presente studio mediante IHC e PCR sono stati confermati i sospetti clinici di forma acuta di PHE in entrambi i casi conferiti con anamnesi di diarrea emorragica, e in quelli di forma cronica complicata nella forma di enterite necrotica.

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, 12 dei 24 animali sono risultati positivi per *L. intracellularis* sia in IHC che in PCR, mentre per tre 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 immunoistochimica.

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 microrganismo e, solo in caso di positività, i campioni saranno esaminati con l'istologia e l'immunoistochimica 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 patogeni (Chase and Lunney, 2019).

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 (Opriessnig et al., 2011; Jensen et al., 2006).

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.

### **3.5 Conclusioni**

Le malattie enteriche del suino, come quelle respiratorie, sono patologie complesse e spesso caratterizzate dalla contemporanea presenza di uno o più agenti microbici 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

- Arnold, M., Crienen, A., Swam, H., Von Berg, S., Jolie, R., Nathues, H., 2019. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different European countries. *Porcine Health Management* 5, 31.
- Baró, J., Segalés, J., Martínez, J., 2015. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: An independent condition or part of the systemic disease? *Veterinary Microbiology* 176, 83–87.
- Boesen, H. T., Jensen, T. K., Jungersen, G., Riber, U., Boye, M., Møller, K., 2005. Development, characterization and diagnostic application of a monoclonal antibody specific for a proteinase K resistant *Lawsonia intracellularis* antigen. *Veterinary microbiology* 105, 199–206.
- Campillo, M., Smith, S.H., Gally, D.L., Opriessnig, T., 2021. Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 33, 621–631.
- Chase, C. & Lunney, J. K., 2019. Immune System. In: *Diseases of Swine*, Wiley, 264–291.
- Darwich, L. & Mateu, E., 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus research* 164, 61–7.
- D'Annunzio, G., Bardini, R., Ostanello, F., Sarli, G., 2021. Porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Large Animal Review* 27, 149–163.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Winkelman, N.L., Mackie-nuss, R.A.C., Marsteller, T.A., Deen, J., 2002. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy *Résumé* 99–107.
- 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. *Polish journal of veterinary sciences* 19, 291–301.
- Jensen, T.K., Vigre, H., Svensmark, B.Å., 2006. Distinction between Porcine Circovirus Type 2 Enteritis and Porcine Proliferative Enteropathy caused by

- Lawsonia intracellularis. *Journal of comparative pathology* 135, 176–182.
- Johansen, M., Nielsen, M., Dahl, J., Svensmark, B., Bækbo, P., Kristensen, C.S., Hjulsager, 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. *Preventive veterinary medicine* 108, 63–72.
- Karuppannan, A.K., Opriessnig, T., 2018. *Lawsonia intracellularis*: Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs. *Frontiers in veterinary science* 5, 181.
- Lawson, G.H.K., Gebhart, C.J., 2000. Proliferative Enteropathy. *Journal of Comparative Pathology* 122, 77–100.
- McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R., Barns, S.M., 1995a. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the Obligately Intracellular Bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 820–825.
- McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., Berschneider, H.M., Rowland, A.C., Lawson, G.H., 1995b. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. *Research in veterinary science* 59, 255–60.
- McOrist, S., Roberts, L., Jasni, S., Rowland, A.C., Lawson, G.H., Gebhart, C.J., Bosworth, B., 1996. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *Journal of comparative pathology* 115, 35–45.
- 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*. *Journal of Comparative Pathology* 145, 261–270.
- 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. *Veterinary Pathology* 41, 624–640.
- 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. *Journal of veterinary science* 21(5), e78.
- Suh, D.K., Song, J.C., 2005. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *Journal of veterinary science* 6, 289–93.
- 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. *Veterinary microbiology* 154, 104–112.
- Thomson, J. R. & Friendship, R. M., 2019. Digestive System. In: *Diseases of Swine*, Wiley, 234–263.
- Uzal, F. A., Plattner, B. L., & Hostetter, J. M., 2016. Alimentary System, in: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 2*, 1–257.
- Vannucci F.A., Gebhart C.J., M.S., 2019. Proliferative enteropathy. In: *Diseases of Swine*, Wiley, 891–911.
- Vannucci, F.A., Borges, E.L., de Oliveira, J.S.V., Guedes, R.M.C., 2010. Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Microbiology* 145, 286–291.
- Vannucci, F.A., Foster, D.N., Gebhart, C.J., 2013. Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC genomics* 14, 421.

## **CAPITOLO 4. L'istologia come *screening* per valutare l'efficacia vaccinale: stima della carica virale tissutale dopo vaccinazione ed esposizione sperimentale**

---

### **4.1 Introduzione**

Il complesso delle malattie associate al circovirus suino (PCVD) comprende una serie di sindromi fortemente impattanti per l'industria suinicola mondiale (Segalés, 2012). Il PCVD è sostenuto dal Porcine Circovirus *type 2* (PCV2), un piccolo virus a DNA senza *envelope* della famiglia Circoviridae (Segalés et al., 2008). Le malattie comprese nel PCVD si manifestano in seguito all'infezione da PCV2 in concomitanza di co-infezione con altri agenti patogeni ed associazione con fattori di *stress* ambientale non infettivi (Alacorn et al., 2011).

Numerose sostituzioni nucleotidiche sono alla base della rapida comparsa di nuovi ceppi di PCV2 in tutto il mondo. In questo modo, oltre ai due gruppi principali originari designati come genotipo "a" (PCV2a) e "b" (PCV2b), in campo sono successivamente emersi ulteriori genotipi (PCV2c, PCV2d, PCV2e) (Harmon et al., 2015; Segalés, 2015).

Prima dell'introduzione del vaccino, il controllo delle PCVDs era limitato principalmente al miglioramento delle strategie di gestione d'allevamento e al controllo delle coinfezioni. La vaccinazione è ora invece uno strumento importante per il controllo dell'infezione da PCV2 (Chae, 2012).

L'introduzione della pratica di vaccinazione su diverse categorie produttive (scrofe e/o suinetti) ha determinato la diminuzione di morbilità e mortalità legate alle

PCVDs nonché il miglioramento dell'efficienza produttiva anche nelle aziende con infezioni subcliniche (Alacorn et al., 2013; Dvorak et al., 2018; Dvorak et al., 2016; Ellis, 2014; Fort et al., 2008; Fraile et al., 2012; Kurmann *et al.*, 2011; Pejsak et al., 2010; Pejsak *et al.*, 2012; Opriessnig et al., 2008a; Opriessnig *et al.*, 2010; Young et al., 2011). Un ulteriore vantaggio della pratica di vaccinazione per PCV2 deriva dalla conseguente protezione anche nei confronti di altri agenti patogeni, soprattutto nel contesto della prevenzione del complesso delle malattie respiratorie del suino (Chae, 2016; Martelli et al., 2013; Park et al., 2013; Opriessnig et al., 2008b).

Mentre è chiaro che i segni clinici di malattia sono controllati dalle pratiche di vaccinazione, il problema in campo è l'insorgenza di infezioni subcliniche con ceppi naturalmente circolanti, che possono potenzialmente causare effetti collaterali quali una riduzione della risposta immunitaria sistemica con ripercussioni sulla resistenza allo sviluppo di malattie. Nonostante il successo della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da circovirus suino tipo 2 (Afghah et al., 2017) e la maggior parte dei suini risulta infatti sieropositiva per gli anticorpi specifici contro PCV2 (Puvanendiran et al., 2011; Velasova et al., 2013). Attualmente, i vaccini contro il PCV2 sono ampiamente utilizzati nelle aziende agricole commerciali, ma poiché non inducono un'immunità sterilizzante, il virus continua a circolare anche nelle aziende suinicole che applicano la vaccinazione (Kekarainen and Segalés, 2015).

È dimostrato che la *clearance* virale coincide con la comparsa di cellule secernenti IFN- $\gamma$  (SC) specifiche per PCV2, prima della comparsa degli anticorpi neutralizzanti PCV2-specifici (Fort et al., 2009). Negli animali che resistono allo

sviluppo della malattia si generano risposte immunitarie cellulari mediate da cellule T CD4+ e CD8+ (Steiner et al., 2009), dirette contro le proteine del capsido (Cap) con produzione di IFN- $\gamma$ -SC, e contro la proteina replicasi (Rep) codificata dal gene ORF1 (Fort et al., 2010).

Secondo l'indagine sperimentale condotta da Fort et al., (2010), in un'infezione subclinica lo sviluppo e la forza di tali risposte, insieme alle risposte umorali, sono probabilmente correlati ai livelli di replicazione di PCV2, essendo influenzati da una riduzione della viremia; inoltre è stata rilevata una differenza nella risposta cellulo-mediata diretta verso Cap e Rep: Cap risulta essere un buon immunogeno per le cellule T, determinando una risposta IFN- $\gamma$ -SC maggiore. L'induzione della risposta cellulo-mediata contro Cap potrebbe essere di fondamentale importanza per evitare la persistenza virale nelle cellule del lignaggio monocitico-macrofagico; viceversa poiché Rep è altamente espressa nelle cellule che supportano la replicazione di PCV2, le risposte cellulari dirette a Rep potrebbero essere importanti per limitare la replicazione del virus e prevenire la progressione dell'infezione verso PMWS (Fort et al., 2010).

Sulla base di queste evidenze, nasce l'esigenza di voler chiarire la dinamica delle risposte cellulo-mediate antigene-specifiche in seguito alla vaccinazione in uno studio infezione-vaccinazione controllato, con il risultato evidente che l'induzione di cellule T CD4+ coproducenti IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  è associata ad una riduzione della viremia e pertanto potrebbe contribuire alla protezione contro PCVD (Koinig et al., 2015).

Diversi vaccini sono stati sviluppati per ridurre l'infezione da PCV2 e la presenza di PCVD, e quasi tutti i vaccini commerciali sono basati sul PCV2a, che mostra una protezione crociata contro gli altri genotipi del PCV2 (Park et al., 2019). Tuttavia vi sono differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale

tra le diverse tipologie di vaccini monodose in commercio e in quelli sperimentali (Guarneri et al., 2021a; Seo et al., 2014a, Zanotti et al., 2015). Uno dei limiti dei vaccini commerciali può essere ascrivibile alla diversità genomica riscontrata nei ceppi di campo, che fanno ipotizzare la possibile fuga immunitaria da vaccino (Xiao et al., 2012); è stata suggerita pertanto la necessità di produzione di vaccini più efficaci formulati sulla base delle differenze nel profilo antigenico tra ceppi vaccinali e di campo (Constans et al., 2015) anche se l'effettiva necessità di vaccini PCV2 specifici per genotipo non è stata confermata negli studi di protezione crociata (Park et al., 2019). Allo stesso modo la diversità nella formulazione degli attuali vaccini commerciali rende complessa la valutazione omogenea della loro efficacia, anche in virtù della mancanza di un dato di riferimento oggettivo riguardante la carica antigenica minima proteggente da fornire affinché siano raggiunti gli obiettivi della vaccinazione.

La proteina del capsido è il determinante antigenico del virus verso cui sono dirette le risposte del sistema immunitario; risulta essere quindi sottoposta ad elevata pressione selettiva, come osservato dal più alto tasso di mutazione nel gene che la codifica (Xiao et al., 2015; Karuppanan and Opriessnig, 2017). È interessante notare che tutti gli attuali vaccini contro il PCV2 si basano su particelle virali intere inattivate o sulla proteina del capsido (Cap) codificata dal gene ORF2 ed assemblata in particelle simili a virus (VLP) (Segalés, 2015). Non sono invece disponibili dati sulle proprietà immunizzanti della proteina Cap non assemblata.

Per colmare questi *gap* nella ricerca sui vaccini-PCV2, il progetto di ricerca corrente dell'IZSLER dal titolo "Parametri di immunità protettiva in suini vaccinati con vaccini PCV2 interi e sub-unitari" (Codice IZSLER: PRC2016013), a cui una

unità di Bologna nel DIMEVET in responsabilità al Prof. Giuseppe Sarli ha partecipato, si è prefissato di analizzare, in due successive fasi di lavoro:

- (a) il rapporto tra massa antigenica PCV2 e risposta immunitaria protettiva dei suini, in soggetti vaccinati con una formulazione vaccinale sperimentale fornita con 3 diversi dosaggi ed in seguito esposti ad infezione da PCV2, ai fini di una migliore standardizzazione (in termini di carica antigenica) dei prodotti vaccinali;
- (b) testare l'efficacia vaccinale di un vaccino sperimentale con proteina Cap non assemblata, individuandola come possibile antigene candidato per la formulazione di vaccini-PCV2, sulla base dell'ipotesi che la configurazione nativa della proteina del capsido PCV2 possa influenzare la sua immunogenicità.

La valutazione dell'efficacia dei vaccini contro PCV2 in seguito a vaccinazione seguita da *challenge* sperimentale, è basata sugli stessi criteri utilizzati per la diagnosi di PMWS (o PCVD-SD): presenza dei segni clinici di malattia, presenza di lesioni microscopiche caratteristiche con dimostrazione della presenza di PCV2 nelle lesioni; a cui si aggiunge la determinazione della carica virale nel siero in associazione ai segni clinici (Chae, 2012).

Dal momento che la carica virale sierica ridotta e la diminuita presenza dell'antigene PCV2 sono fortemente correlati con bassi punteggi istopatologici nei tessuti linfoidei, i vaccini sono in grado inoltre di ridurre il carico di PCV2 nel siero e nei linfonodi, con conseguente riduzione delle lesioni istologiche (Segalés et al., 2009).

La valutazione morfologica dell'estensione della deposizione dell'antigene PCV2 mediante tecniche di IHC ed ISH e della deplezione linfoide nei linfonodi sono

criteri critici nella valutazione dell'efficacia dei vaccini-PCV2, trattandosi di evidenze fondamentali per la diagnosi di PCVD (Fort et al., 2009; Opriessnig et al., 2009; Seo et al., 2014b; Shen et al., 2010). L'esame istopatologico si configura quindi come componente metodologica imprescindibile nello studio di efficacia vaccinale di formulazioni sperimentali per contrastare lo sviluppo di PCVD; pertanto, è stato parte integrante dei materiali e metodi impiegati in questo studio di valutazione dell'efficacia di vaccini sperimentali interi e ricombinanti con proteina Cap, in associazione agli esami sierologici ed immunologici.

## **4.2 Prova di vaccinazione 1: vaccino-PCV2 a virus intero inattivato**

### *4.2.1 Materiali e metodi*

#### *4.2.1.1 Disegno sperimentale*

La casistica dello studio si compone di 20 suini (ibrido Goland) di 40 giorni di vita prelevati da tre distinte nidiare di un'azienda suinicola ad elevato *standard* sanitario e di biosicurezza, in cui nel corso dell'ultimo anno non erano stati segnalati casi riferibili a PCVD.

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati condotti presso l'IZSLER, in conformità con l'approvazione da parte del Comitato Etico interno all'IZSLER per la Sperimentazione Animale, dopo aver ricevuto una specifica Licenza di Progetto (n. 230/2018-PR) rilasciata dal Ministero della Salute Italiano, in conformità con le linee guida dell'Unione Europea (Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici). Il progetto prevedeva una

parte delle attività (diagnostica istopatologica) da svolgere presso il Servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET, tesa a stabilire la presenza di lesioni post-infezione dei diversi gruppi e a stimare la carica virale residua nei tessuti linfoidi.

Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi (A, B, C, D) di 5 suini ciascuno con residui uniformi di anticorpi materni anti-PCV2. I suini sono stati vaccinati con un vaccino sperimentale costituito da ceppo PCV2b intero inattivato con beta-propionolattone, formulato in adiuvante, somministrato a tre gruppi di cinque animali (A, B, C) in dose decrescente (800/266/88 ng) dell'antigene sperimentale PCV2b per ogni gruppo e confrontato con un gruppo controllo non vaccinato (D) che ha ricevuto solo l'adiuvante in PBS. Tutti gli animali, quattro settimane dopo l'inoculazione IM (nella regione del collo) di 0,5 ml di formulazione vaccinale, sono stati esposti ad infezione per via intranasale con 2 mL di una sospensione contenente 10<sup>5,3</sup> dosi infettive di coltura tissutale al 50% (TCID<sub>50</sub>) del suddetto ceppo omologo di PCV2b.

Per le valutazioni relative all'efficacia e all'azione protettiva del vaccino in seguito al *challenge* vaccinazione-infezione, oltre alle indagini istopatologiche, sono stati condotti i seguenti test: misurazione degli anticorpi totali e neutralizzanti anti-PCV2 tramite ELISA *competitive* and IF secondo metodi precedentemente descritti (Sala et al., 2000; Zanotti et al., 2015); quantificazione, successiva ad estrazione, del DNA di PCV2 nel siero tramite *Real-Time* PCR quantitativa (Olvera et al., 2004); *PCV2-specific interferon-γ release assay*, per misurare la risposta immunitaria cellulo-mediata al PCV2 in campioni di sangue intero eparinizzato, eseguito con valori soglia definiti come precedentemente descritto (Zanotti et al., 2015).

#### 4.2.1.2 *Esame necroscopico ed indagini istologiche*

L'esame necroscopico è stato condotto presso la sala necroscopica della sezione di Brescia dell'IZSLER in tre diverse giornate tra 37 e 49 giorni post-infezione,

in cui gli animali sono stati soppressi secondo protocollo autorizzato dal Ministero, con identificazione *random* dei soggetti da sopprimere, in maniera da garantire la presenza di soggetti appartenenti a ciascun gruppo in ogni giornata di soppressione (Tabella 13).

*Tabella 13. Calendario di campionamento: distribuzione uniforme dei soggetti di ciascun gruppo nelle tre giornate fissate tra 37 e 49 giorni post-infezione.*

	Prima giornata	Seconda giornata	Terza giornata
Gruppo A (800ng)	5	15	14
	17		18
Gruppo B (266 ng)	19	10	12
	20	13	
Gruppo C (88 ng)	11	8	9
	7	16	
Gruppo D	3	1	2
(controllo)	4		6

Durante l'esame necroscopico campioni di tessuto sono stati fissati in formalina tamponata: linfonodo mesenterico, milza, linfonodo mediastinico, linfonodo inguinale superficiale, tonsille, ileo, polmone a livello di biforcazione tracheale, bronchi, cuore, fegato, rene, trachea e pancreas. I tessuti fissati sono stati inclusi in paraffina presso il Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università degli Studi di Bologna e successivamente sono state ricavate sezioni di 4 µm di spessore poi colorate con ematossilina-eosina.

#### 4.2.1.3 Metodica immunoistochimica

L'indagine immunoistochimica per PCV2 è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (Mab F217) gentilmente fornito dal Dr. Gordon Allan (Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Belfast, UK). Brevemente: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; le perossidasi endogene sono state bloccate con perossido di idrogeno allo 0,3% in metanolo per 30'. A seguire è stato effettuato il trattamento con proteasi XIV allo 0,05% a 37°C. L'anticorpo primario necessario per legare l'antigene, con diluizione 1:50, è stato aggiunto alle sezioni e incubato overnight a 4°C; le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo secondario *goat anti-mouse* biotinilato (DAKO) e successivamente con il complesso streptavidina-biotina-perossidasi (VECTASTAIN Elite ABC kit). La reazione è stata evidenziata utilizzando diaminobenzidina (0,04% per 10') come cromogeno. Dopo l'impiego del sistema di rivelazione, le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Papanicolau, disidratate e montate con DPX.

Come controllo positivo (CTR+) è stato utilizzato tessuto linfoide dell'ileo di suinetto affetto da PMWS spontanea, del quale era stata confermata la presenza di PCV2 mediante PCR. Come controllo negativo, sullo stesso tessuto è stato impiegato un anticorpo dello stesso isotipo dell'anticorpo primario (IgG1) ma di irrilevante specificità.

La prova di funzionalità e specificità dell'anticorpo impiegato in IHC è stata stimata valutando il risultato della reazione immunoistochimica per PCV2 nel caso sicuro positivo (CTR+). La funzionalità di ciascuna prova è stata garantita dall'evidenza della presenza di un precipitato granulare brunastro nel citoplasma di cellule centrofollicolari o infiltranti la lamina propria dell'ileo del caso controllo. La specificità invece è stata dimostrata dall'assenza di reazione immunoistochimica in

sezioni di tessuti seriali trattate nel corso della prova mediante omissione dell'anticorpo primario.

#### *4.2.1.4 Criteri di interpretazione*

Per l'interpretazione diagnostica delle indagini istologiche, contestualmente all'osservazione delle sezioni colorate con ematossilina-eosina, è stato applicato un sistema di graduazione atto a descrivere l'entità dell'iperplasia del tessuto linfoide, dettagliato in Figura 33.

Nei tessuti linfoide bersaglio degli animali campionati, la quantità di antigene virale saggiata con indagine immunohistochimica è stata stimata mediante una variazione dei criteri seguiti da Opriessnig et al. (2010), prevedendo la possibilità di 4 differenti gradi di rilevazione dell'antigene:

- Grado 0. assenza della reazione immunohistochimica;
- Grado 1. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli inferiore al 25% dei follicoli presenti (<25%);
- Grado 2. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti compreso tra il 25-50%;
- Grado 3. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti maggiore del 50% (>50%).

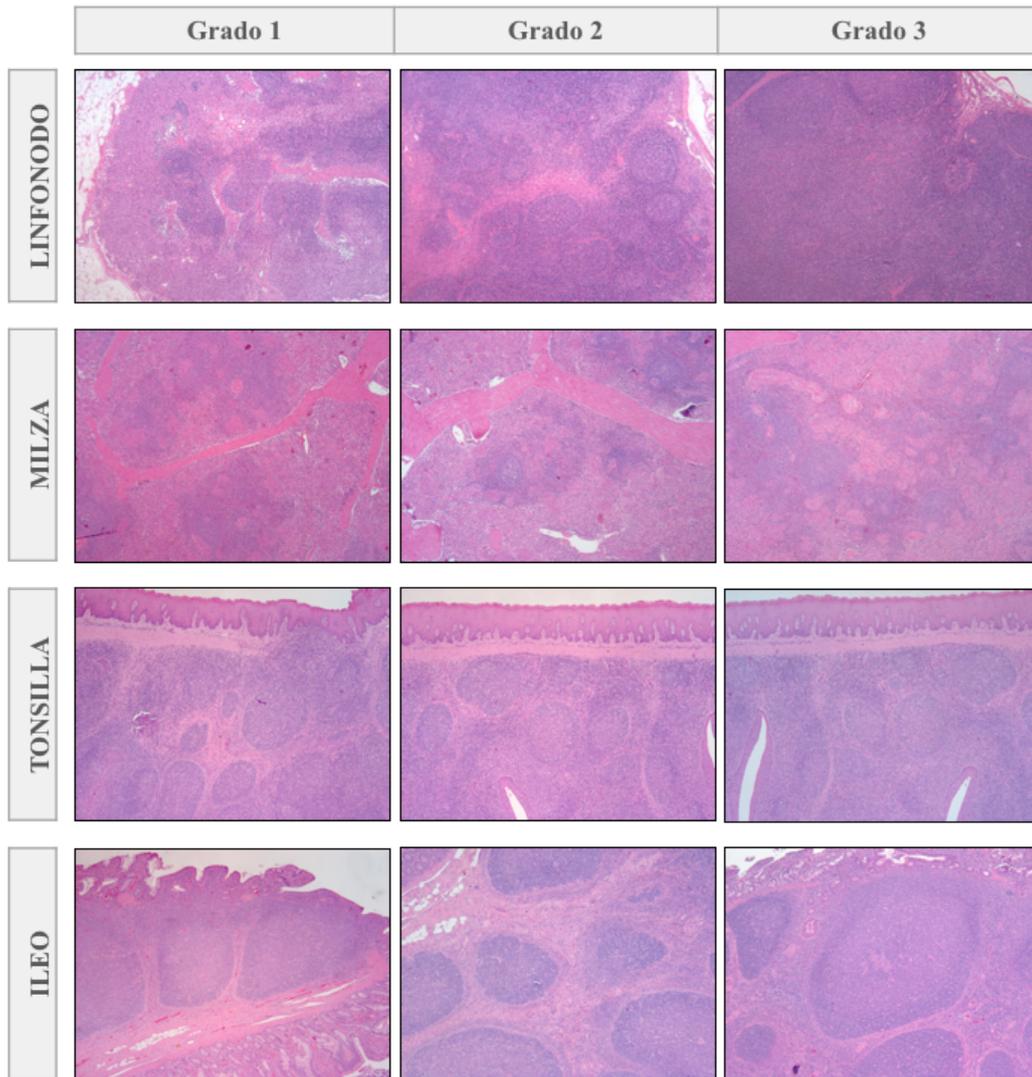


Figura 33. Grading dell'iperplasia nei tessuti linfoidei. Grado 1 o tessuto linfoide non reattivo: linfonodi (presenza di follicoli primari e tessuto medulla-like ben rappresentato); milza (presenza di guaine linfoide periarteriolariformate unicamente da linfociti maturi con assenza di centri germinativi); tonsilla (presenza di tessuto linfoide diffuso senza centri germinativi); ileo (presenza di tessuto linfoide con assenza di centri germinativi). Grado 2: linfonodi (presenza di follicoli secondari in quasi tutto il tessuto linfoide ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare con riduzione percentuale della presenza di tessuto medulla-like, comunque sempre osservabile); milza (presenza di guaine linfoide periarteriolariformate espanse, nel cui spessore è possibile apprezzare la presenza di centri germinativi); tonsilla e ileo (presenza di centri germinativi in non oltre il 50% del tessuto osservabile); Grado 3: linfonodi (marcata iperplasia reattiva di tutti i follicoli osservabili ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare, che va ad occupare completamente, cancellandone l'osservazione, il tessuto medulla-like); milza (espansione pericentrica delle guaine linfoide periarteriolariformate con presenza di numerosi centri germinativi e tendenza alla confluenza con i centri linfoidei adiacenti); tonsilla ed ileo (presenza di centri germinativi in tutto il tessuto linfoide osservabile). Modificato da (Guarneri et al., 2021c).

#### 4.2.2 Risultati

##### Il vaccino PCV2b ha fornito una protezione dose-dipendente

Come previsto, non sono stati osservati segni clinici di PCVD dopo la vaccinazione e l'infezione, sia nel gruppo di controllo che in quelli vaccinati. La viremia

dopo il *challenge* è stata osservata in tutti i suini di controllo, così come in 3 suini dei gruppi da 266 e 88 ng di antigene (uno e due, rispettivamente). Nessun suino del gruppo da 800 ng ha sviluppato viremia dopo il *challenge* (Figura 34).

Group D, control PCV2 genome copies/mL					Group C, 88 ng PCV2 / dose PCV2 genome copies/mL				
Pig	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 35	Pig	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 35
6	0	0	198	17	11	0	32	26,520	1290
2	0	0	25	0	7	0	0	0	0
3	0	285	105	103	8	0	0	0	0
4	0	210	36	0	9	0	0	0	0
1	0	6	175	0	16	0	0	0	162

Group B, 266 ng PCV2/ dose PCV2 genome copies/mL					Group A, 800 ng PCV2 /dose PCV2 genome copies/mL				
Pig	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 35	Pig	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 35
10	0	0	0	0	5	0	0	0	0
12	0	0	0	0	17	0	0	0	0
13	0	0	0	0	18	0	0	0	0
19	0	269	0	0	14	0	0	0	0
20	0	0	0	0	15	0	0	0	0

Figura 34. Viremia dopo il challenge vaccinazione-infezione con PCV2. I sieri di suini infetti da PCV2 sono stati analizzati mediante PCR quantitativa per il gene ORF2 dopo l'estrazione del DNA. I risultati sono espressi come copie del genoma del PCV2/mL di siero. (Guarneri et al., 2021a).

### Le risposte anticorpali erano influenzate dalle dosi di antigene PCV2b

I risultati ottenuti mediante ELISA su campioni di siero comprendono titoli non predittivi di protezione per i singoli animali. Spesso, il picco dei titoli Ab coincideva con il picco della viremia del PCV2. Tuttavia, è stato dimostrato che la dose di Ag influenza i titoli Ab medi, con differenze significative a DPV 21 e DPI 7 (Figura 35A).

I risultati ottenuti dei saggi sugli anticorpi neutralizzanti (NA) su campioni di siero sono mostrati in Figura 35B. Ancora una volta, è stato dimostrato che la dose di Ag influenza significativamente i titoli medi di NA a DPV 21, così come a DPI 7 e 14. È stata osservata una diminuzione significativa dei titoli di NA tra DPI 14 e 21 nei gruppi di suini di 266 e 88 ng di antigene (Figura 35B).

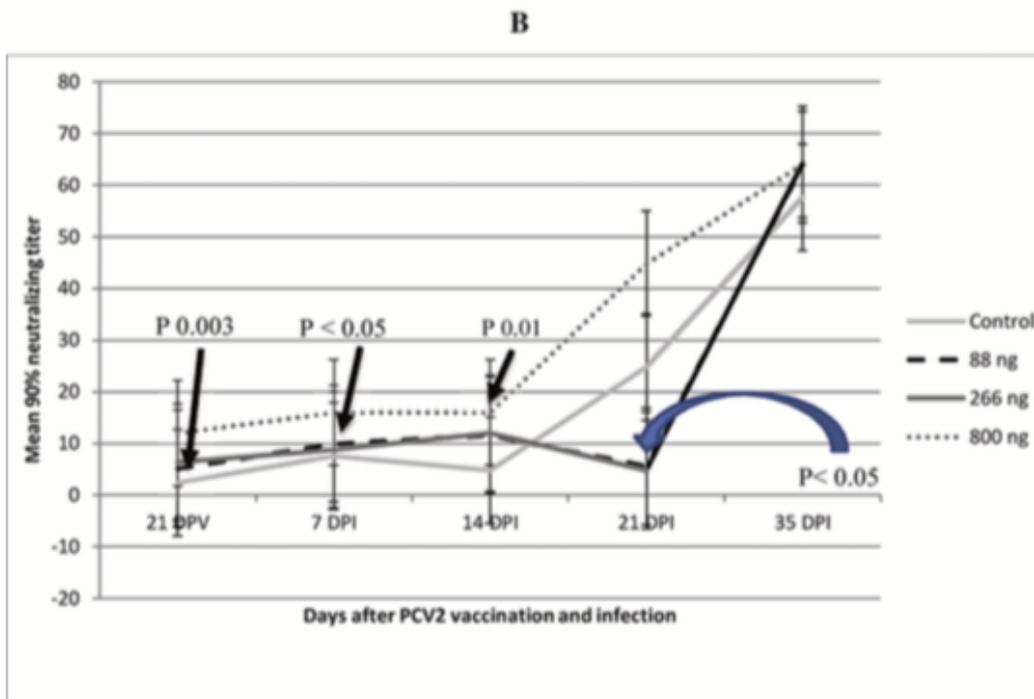
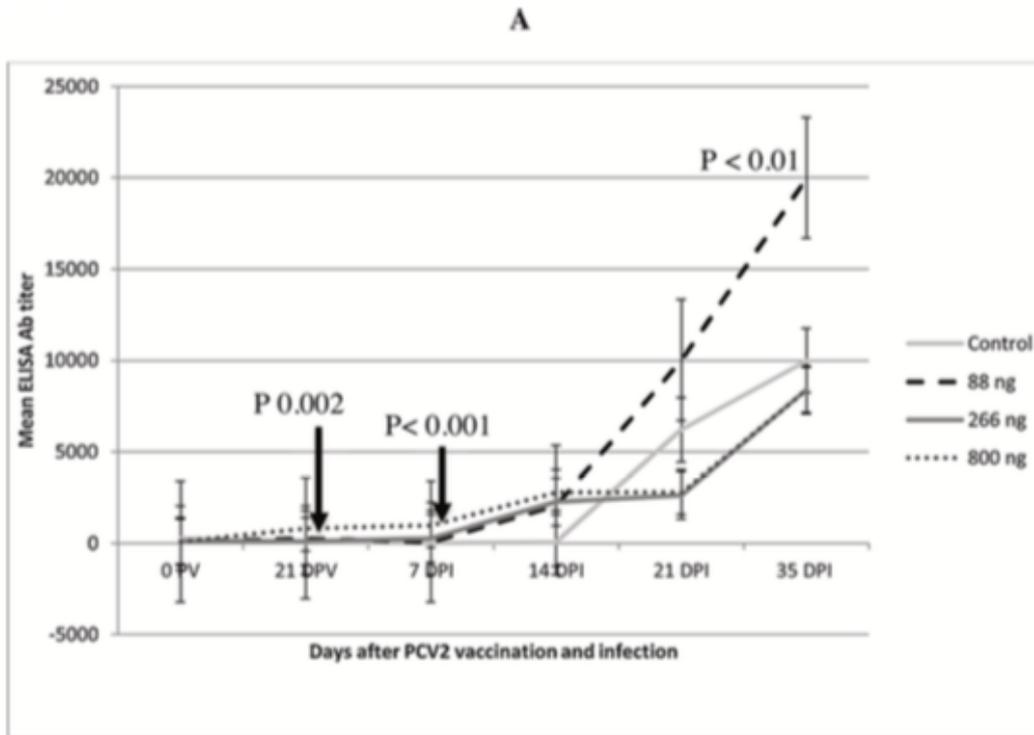


Figura 35. A. Titoli anticorpali ELISA. Il titolo di anticorpi totali specifici per PCV2 è stato misurato nel siero mediante un ELISA competitivo, come precedentemente descritto (Sala G. et al. 2000). I titoli Ab medi dei suini vaccinati con PCV2 e di controllo sono mostrati in momenti diversi dopo la vaccinazione e l'infezione. Differenze significative sono state osservate a 21 DPV, 7 e 35 DPI. B. Saggi di anticorpi neutralizzanti. Gli anticorpi neutralizzanti nei sieri sono stati studiati mediante colorazione immunofluorescente nelle cellule PK-15c28 come descritto in uno studio precedente (Zanotti et al., 2015). I titoli sono stati espressi come la diluizione che provoca una riduzione del 90% delle FFU osservate nei pozzetti di controllo. I titoli Ab medi sono mostrati in momenti diversi dopo la vaccinazione e l'infezione da PCV2. Differenze significative sono state osservate a 21 DPV e a 7, 14 DPI. Una diminuzione significativa dei titoli NA è stata osservata tra DPI 14 e 21 nei suini dei gruppi 266 e 88 ng (Guarneri et al., 2021a).

La risposta IFN- $\gamma$  alla vaccinazione contro il PCV2 era un marker

di risposta immunitaria protettiva

La risposta IFN- $\gamma$  specifica per PCV2 nei campioni di sangue intero al DPV 21 si è dimostrata un robusto correlato di protezione: tutti i suini che hanno sviluppato una risposta IFN- $\gamma$  erano completamente protetti contro l'infezione da *challenge* in termini di viremia post-infezione (Figura 34 e 36). È interessante notare che l'infezione provocata da PCV2 non ha indotto alcuna risposta IFN- $\gamma$  rilevabile nel gruppo di controllo, in accordo con uno studio sul PCV2a (Zanotti et al., 2015).

	Pigs	DPV 0	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 35
CONTROL, GROUP D	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
88 ng PCV2, GROUP C	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	7	NEG	141	NEG	NEG	115	NEG
	8	NEG	NEG	NEG	44	31	NEG
	9	NEG	52	NEG	30	39	148
	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
266 ng PCV2, GROUP B	10	NEG	NEG	NEG	25	NEG	NEG
	12	NEG	20	NEG	29	NEG	NEG
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	19	NEG	NEG	NEG	NEG	29	NEG
	20	NEG	50	DUB	98	54	NEG
800 ng PCV2, GROUP A	5	NEG	NEG	NEG	56	77	NEG
	17	NEG	112	NEG	36	NEG	NEG
	18	NEG	57	NEG	64	NEG	NEG
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	35	NEG
	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Figura 36. Saggio di rilascio di IFN-gamma specifico per PCV2 su campioni di sangue intero. Campioni di sangue intero eparinizzato sono stati impiegati in un test di rilascio di IFN- $\gamma$  specifico per PCV2 in momenti diversi dopo la vaccinazione e l'infezione sperimentale. I risultati sono espressi in termini di Delta mOD, ovvero la differenza di mOD tra i pozzetti stimolati con PCV2 e quelli di controllo. La tabella mostra i valori numerici Delta mOD dei campioni positivi al test ( $\geq 20$  mOD). NEG: campione negativo al test. DUB: campione dubbio (differenza mOD  $\geq 10$  mOD,  $< 20$  mOD) (Guarneri et al., 2021a).

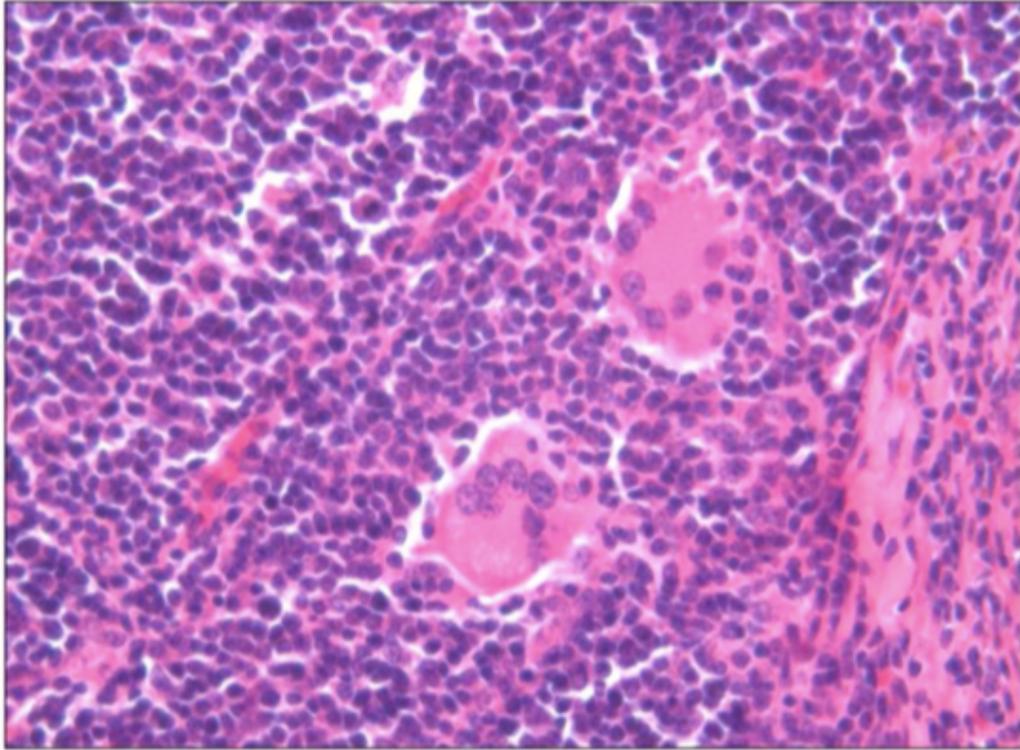
*L'infezione da PCV2 ha generato rare cellule reattive e/o positive al PCV2 nelle strutture linfoidi*

Come previsto, nei tessuti in esame non è stata trovata alcuna lesione macroscopica specifica per PCVD. L'unico reperto istologico correlato all'infezione da PCV2 era la presenza di cellule istiocitarie sparse e/o singole cellule giganti multinucleate, localizzate al centro dei follicoli (Figura 37 – Panel A) senza formazione di granuloma. In ogni soggetto sono state esaminate sei strutture linfoidi; nei 5 soggetti del gruppo di controllo non vaccinati sono state osservate cellule istiocitarie giganti reattive e/o centrollicolari in 4 tessuti appartenenti a 3 soggetti diversi con 30 strutture linfoidi in totale. Complessivamente nei 15 soggetti dei 3 gruppi vaccinati sono state riscontrate cellule istiocitarie reattive e/o giganti in 28 tessuti linfoidi su 86, appartenenti a ciascuno dei 15 soggetti (Tabella 14). Complessivamente, la percentuale di cellule istiocitarie giganti reattive e/o centrollicolari era maggiore nei vaccinati (33 %) rispetto ai soggetti non vaccinati (13 %) ( $P = 0,056$ , tendenza). In IHC la prevalenza di sezioni e cellule positive al PCV2 era molto bassa (Figura 37 – Panel B). Complessivamente, è stata dimostrata una carica virale residua in 3 soggetti su 20, appartenenti ai controlli non vaccinati (1 suino) e al gruppo di 88 ng di antigene vaccinale (2 suini), rispettivamente (Tabella 14).

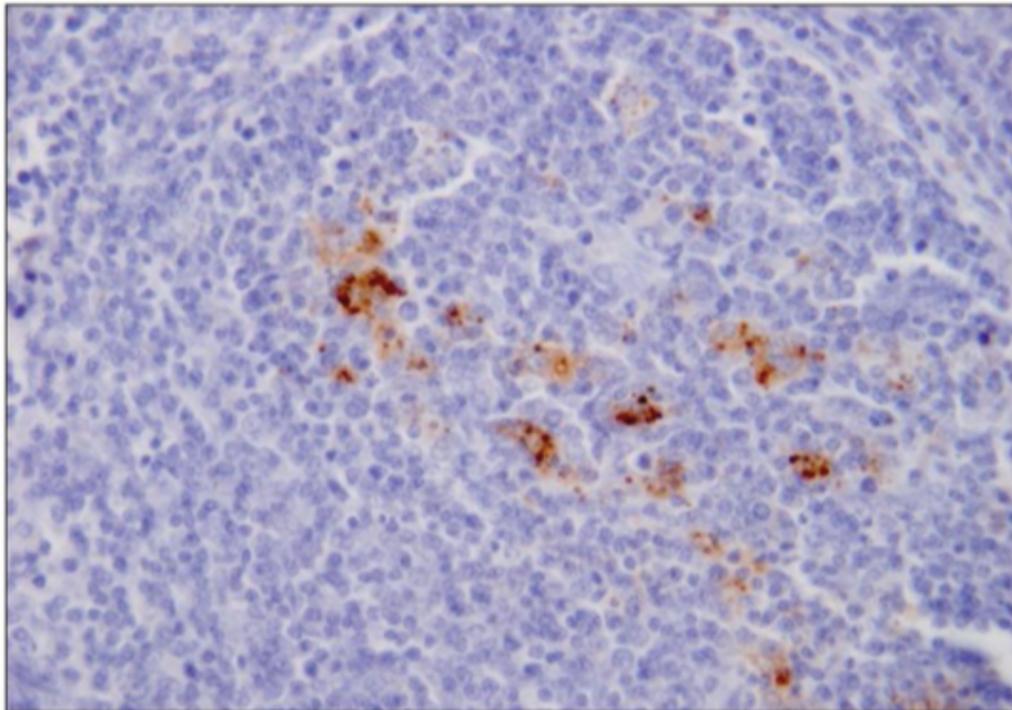
Tabella 14. Risultati della graduazione istologica dell'iperplasia nelle diverse stazioni linfoidi oggetto di studio (per la definizione dei criteri vedi M&M). CG/M, stazione linfoide con presenza di isolate cellule giganti e/o multinucleate centrollicolari. -, sezione mancante; \* caso/tessuto con reazione immunohistochimica positiva per PCV2 (Guarneri et al., 2021c).

Gruppi	Id. Soggetti	Cod. Id. DIMEVET	LN mesenterico	Milza	LN mediastinico	LN inguinale sux.	Tonsille	Ileo
A	15	17014	3	1	2	1	3 (CG/M)	3 (CG/M)
	5	16921	3	2	3	1	2 (CG/M)	2
	17	16922	3	1	2	1	2	3 (CG/M)
	18	17020	3 (CG/M)	2	2 (CG/M)	2 (CG/M)	2 (CG/M)	-
	14	17019	2 (CG/M)	2	2 (CG/M)	2 (CG/M)	2 (CG/M)	3 (CG/M)
B	10	17010	3 (CG/M)	1	2	1	3	3
	13	17011	3	1	3	2	3	3 (CG/M)
	19	16916	3	1	2 (CG/M)	1	3	2
	20	16918	3	2	2 (CG/M)	2	2	2
	12	17017	-	2	3 (CG/M)	2	3 (CG/M)	-
C	11*	16919	3*	2*	1	2*	3	3 (CG/M)
	16*	17013	3 (CG/M)*	2	2 (CG/M)*	2	3 (CG/M)*	2 (CG/M)*
	8	17012	2	1	2	2	3 (CG/M)	-
	7	16920	3	2	2	1	3 (CG/M)	3
	9	17018	3	1	2	2	2 (CG/M)	2 (CG/M)
D	2	17015	2	2	2	1	3	2 (CG/M)
	3*	16914	3 (CG/M)*	2*	2*	1*	3*	3 (CG/M)
	4	16915	3	3	2	3	3	2
	1	17009	3	2	3	2	3	3
	6	17016	2	2	2	2	3	2 (CG/M)

**Panel A**



**Panel B**



*Figura 37. Risultati dell'esame istopatologico ed immunoistochimico. I tessuti dei suini infetti da PCV2 sono stati inclusi in cera di paraffina, sezionati con uno spessore di 4  $\mu$ m e colorati con ematossilina ed eosina. Su sezioni di tessuto linfoide, l'IHC per il rilevamento del PCV2 è stato eseguito utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per PCV2. Pannello A. Gruppo D soggetto 6, ileo, cellule giganti multinucleate nel tessuto linfoide. Ematossilina-eosina. 40 $\times$ . Pannello B. Reazione IHC per la quantificazione della carica virale. Gruppo C soggetto 16: tonsille che mostrano cellule positive per la presenza di antigene PCV2 (colorazione marrone) in un follicolo. 40 $\times$  (Guarneri et al., 2021a).*

## **4.3 Prova di vaccinazione 2: vaccino ricombinante a base di proteina ORF2 di PCV2b**

### *4.3.1 Materiali e metodi*

#### *4.3.1.1 Disegno sperimentale*

I dettagli sulla produzione del virus, degli anticorpi monoclonali, dell'antigene ORF2 ricombinante e della formulazione vaccinale sono dettagliate nella pubblicazione scientifica di Guarneri et al., 2021b.

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati condotti presso l'IZSLER, in conformità con l'approvazione da parte del Comitato Etico interno all'IZSLER per la Sperimentazione Animale, dopo aver ricevuto una specifica Licenza di Progetto (n. 230/2018-PR) rilasciata dal Ministero della Salute Italiano, in conformità con le linee guida dell'Unione Europea (Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici). Lo studio è stato condotto su 20 suini ibridi *Goland* di 3 nidiatae (denominati *White*, *Green* e *Red* sulla base del colore del marchio auricolare), nati in un allevamento con alti livelli di biosicurezza e situato in provincia di Brescia. Dopo lo svezzamento a 25 giorni di età, i suinetti sono stati trasferiti nelle unità di isolamento IZSLER cinque giorni dopo e sottoposti ad ispezione clinica. Un primo campione di sangue è stato prelevato da ciascun animale due giorni dopo l'arrivo per misurare i titoli anticorpali di origine materna (MDA) contro il PCV2 mediante ELISA competitivo. Dopo altri 2 giorni, i suini sono stati assegnati a quattro gruppi di 5 soggetti ciascuno (tutti includevano almeno un suino per nidiatae) con una distribuzione equilibrata dei titoli MDA (Tabella 15). Dopo altri tre giorni, tre

gruppi di cinque maiali ciascuno (denominati A, B e C) sono stati immunizzati per via intramuscolare con 0,5 mL di vaccino sperimentale ricombinante con proteina Cap contenenti rispettivamente 10,8, 3,6 e 1,2 microgrammi di proteina Cap, mentre il gruppo D è stato trattato con 0,5 ml di *placebo* (Tabella 15).

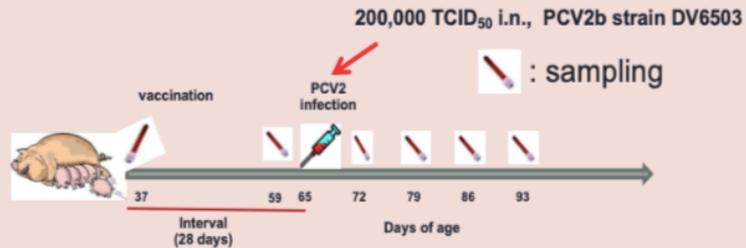
Tabella 15. Gruppi vaccinali e titoli di anticorpi di derivazione materna (MDA) nei diversi gruppi. A seguito dell'assegnazione ai gruppi di studio, in ciascun gruppo era rappresentato almeno un suino delle tre cucciolate (Red, White, Green, rispettivamente). Inoltre, non vi era alcuna differenza significativa tra i titoli MDA medi (saggio ELISA Ab) dei 4 gruppi prima della vaccinazione. \* Il maiale 057 è morto di polmonite al 5 DPV (Guarneri et al., 2021b).

Control, PBS + Adjuvant Group D				1.2 µg ORF2/Dose Group C			
Number	Litter	Starting Titer	Titer DPV 21	Number	Litter	Starting Titer	Titer DPV 21
057 *	White	1/1000	-	080	White	1/1000	1/100
076	White	1/1000	1/100	100	White	1/100	1/100
059	Green	1/1000	1/100	077	Green	1/1000	1/100
060	Green	1/1000	1/100	078	Green	1/1000	1/100
058	Red	1/1000	1/100	079	Red	1/1000	1/1000
3.6 µg ORF2/Dose Group B				10.8 µg ORF2/Dose Group A			
Number	Litter	Starting Titer	Titer DPV 21	Number	Litter	Starting Titer	Titer DPV 21
092	White	1/1000	1/100	097	White	1/1000	1/100
096	White	1/1000	1/1000	099	Green	1/1000	1/100
093	Green	1/1000	1/1000	091	Red	1/100	1/100
056	Red	1/100	1/100	095	Red	1/1000	1/1000
094	Red	1/1000	1/100	098	Red	1/1000	1/100

Ventotto giorni dopo tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 2 mL di una sospensione contenente  $10^{5,3}$  dosi infettanti di coltura tissutale al 50% (TCID<sub>50</sub>) del ceppo PCV2b DV6503. Il sangue è stato prelevato in provette sottovuoto eparinizzate e provette senza anticoagulante a 21 giorni successivi alla vaccinazione (DPV) e a 7, 14, 21 e 28 giorni post-infezione (DPI). Gli animali sono stati soppressi a 42 (gruppi C-D) e 43 (gruppi A-B) DPI, per eseguire l'autopsia. Il disegno sperimentale è riassunto nella Figura 38.

## Experimental planning

Groups (Goland hybrid piglets) were matched in terms of mean maternally-derived antibody (MDA) level, and balanced representation of three litters. Age at weaning: 25 days; at arrival: 30 days; at first sampling: 32 days; at grouping: 34 days.



❖ Clinical inspections before and after challenge

❖ Blood samples to evaluate PCV2 viremia ( genome copies/mL in real-time PCR), PCV2-specific cytokines, Ab responses (ELISA and neutralization assays).

Figura 38. Disegno sperimentale. La linea atemporale mostra la serie di eventi di vaccinazione, campionamento e challenge con infezione virale. L'eutanasia e successivo esame necroscopico si collocano a 107 giorni d'età (gruppi C, D) e 108 giorni d'età (gruppi A, B) (Guarneri et al., 2021b).

Per le valutazioni relative all'efficacia e all'azione protettiva del vaccino in seguito al *challenge* vaccinazione-infezione, oltre alle indagini istopatologiche, sono stati condotti sia la valutazione del profilo dell'immunità cellulo-mediata che i seguenti test: misurazione degli anticorpi totali e neutralizzanti anti-PCV2 tramite ELISA *competitive* and IF secondo metodi precedentemente descritti (Sala et al., 2000; Zanotti et al., 2015); quantificazione del DNA di PCV2 nel siero tramite Real-Time PCR quantitativa dopo estrazione del DNA (Olvera et al., 2004).

### 4.3.1.2 Profilo di immunità cellulo-mediata

Per la valutazione del profilo di immunità cellulo-mediata sono state condotte le seguenti analisi, come descritto in Guarneri et al., (2021b):

- PCV2-specific interferon- $\gamma$  release assay, per misurare la risposta immunitaria cellulo-mediata al PCV2 in campioni di sangue intero eparinizzato, eseguito con valori soglia definiti come precedentemente descritto (Zanotti et al., 2015).
- saggio citometrico per IFN- $\gamma$  intracellulare per linfociti T positivi all'IFN- $\gamma$  in PBMC di tre maiali per gruppo;
- saggio ELISPOT (*interferon-gamma enzyme-linked immunospot*) e FLUOROSPOT specifici per l'antigene ORF2 per cellule secernenti citochine.

#### 4.3.1.3 Necroscopia e istopatologia

All'autopsia sono stati raccolti campioni di tessuti bersaglio del PCV2: linfonodi mesenterici, mediastinici e inguinali superficiali, milza, ileo, tonsille, polmone, trachea e bronchi, cuore, fegato, rene e pancreas. I tessuti fissati in formalina tamponata al 10% sono stati processati per l'esame istopatologico. Sono stati quindi inclusi in paraffina, sezionati con uno spessore di 4  $\mu$ m e colorati con ematossilina ed eosina. L'iperplasia linfoide è stata classificata secondo metodo precedentemente pubblicato (Guarneri et al., 2021c) riassunto nella Figura 33 di questo capitolo. Le sezioni di tessuto sono state selezionate per l'esame immunohistochimico come precedentemente descritto per la valutazione semiquantitativa della positività all'antigene PCV2 (Guarneri et al., 2021a).

#### 4.3.2 Risultati

*Non è stata osservata alcuna PCVDs dopo il challenge nei soggetti vaccinati ma il vaccino sperimentale PCV2 non ha indotto protezione virologica*

La viremia dopo il *challenge* è stata osservata in tutti i suini di controllo e vaccinati, a partire da DPI 14 (Tabella 16). La viremia era più alta a DPI 14 nel gruppo C (1,2 microgrammi/dose), in cui è diminuita significativamente fino a DPI 28 ( $p < 0,001$ ). Al contrario, negli altri gruppi studiati non è stato osservato alcun decadimento significativo della viremia dopo 14 DPI. Inoltre, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i livelli di viremia dei quattro gruppi sperimentali in qualsiasi momento dopo l'infezione.

Tabella 16. Viremia post-challenge vaccinazione-infezione; vaccino ricombinante Cap (Guarneri et al., 2021b).

Group D, Control PCV2 Genome Copies/mL							Group C, 1.2 µg ORF2/Dose PCV2 Genome Copies/mL						
Pig	DPV0	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28	Pig	DPV 0	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28
057 *	NEG	-	-	-	-	-	077	NEG	NEG	NEG	$35.7 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$3.79 \times 10^5$
058	NEG	NEG	NEG	$4.25 \times 10^6$	$3.31 \times 10^5$	$4.48 \times 10^4$	078	NEG	NEG	NEG	$25.3 \times 10^6$	$1.33 \times 10^6$	$8.69 \times 10^4$
059	NEG	NEG	NEG	NEG	$17.2 \times 10^6$	$1.33 \times 10^5$	079	NEG	NEG	NEG	$18.4 \times 10^6$	$6.13 \times 10^5$	$3.91 \times 10^4$
060	NEG	NEG	NEG	$2.08 \times 10^6$	$1.45 \times 10^5$	$10^4$	080	NEG	NEG	NEG	$8.86 \times 10^5$	$3.05 \times 10^4$	$1.74 \times 10^3$
076	NEG	NEG	NEG	NEG	$4.89 \times 10^3$	NEG	100	NEG	NEG	NEG	$15.6 \times 10^6$	$2.68 \times 10^5$	$9.07 \times 10^4$
Group B, 3.6 µg ORF2/Dose PCV2 Genome Copies/mL							Group A, 10.8 µg ORF2/Dose PCV2 Genome Copies/mL						
Pig	DPV 0	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28	Pig	DPV 0	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28
056	NEG	NEG	NEG	NEG	$1.52 \times 10^4$	$3.74 \times 10^4$	091	NEG	NEG	NEG	$4.89 \times 10^5$	$8.00 \times 10^5$	$3.53 \times 10^4$
092	NEG	NEG	NEG	$2.23 \times 10^5$	NEG	$1.28 \times 10^4$	095	NEG	NEG	NEG	NEG	$5.06 \times 10^4$	$9.92 \times 10^4$
093	NEG	NEG	NEG	$3.31 \times 10^5$	$1.34 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	097	NEG	NEG	NEG	$2.08 \times 10^4$	$2.04 \times 10^4$	$4.29 \times 10^3$
094	NEG	NEG	NEG	$1.51 \times 10^5$	$8.69 \times 10^4$	$3.17 \times 10^3$	098	NEG	NEG	NEG	$2.49 \times 10^5$	$2.76 \times 10^5$	$2.17 \times 10^4$
096	NEG	NEG	NEG	NEG	$2.02 \times 10^5$	$8.18 \times 10^4$	099	NEG	NEG	NEG	$3.45 \times 10^6$	$4.43 \times 10^5$	$4.69 \times 10^4$

*Il vaccino ricombinante Cap non ha indotto una risposta anticorpale significativa al PCV2*

I risultati ottenuti dall'ELISA sono mostrati nella Figura 39. In tutti gli animali di controllo si è verificato un regolare ed omogeneo calo dei titoli anticorpali di derivazione materna (MDA), mentre alcuni animali vaccinati hanno mantenuto i loro titoli MDA fino a 21 DPV, principalmente nel Gruppo da 3,6 microgrammi (Tabella 15). La sierconversione dopo l'infezione da PCV2 è apparsa a 21 DPI in tutti i gruppi studiati (Figura 39), dopo l'insorgenza della viremia da PCV2 a 14 DPI (Tabella 16).

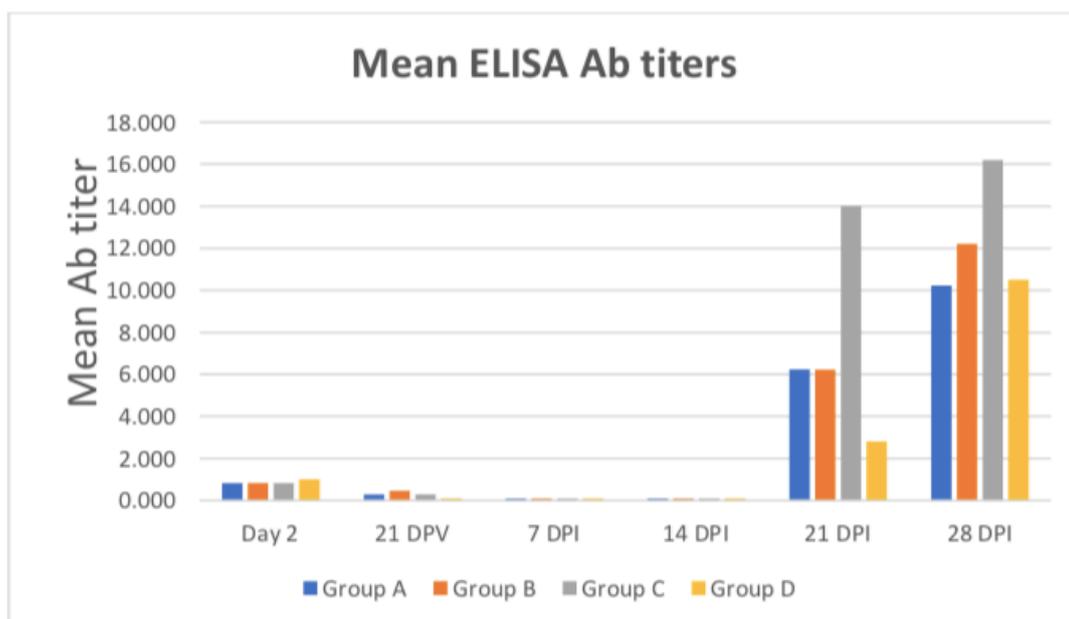


Figura 39. Decorso temporale dei titoli Ab ELISA medi dei suini vaccinati con antigene ORF2 (gruppi A-C) e di controllo (gruppo D). Nessuna risposta Ab significativa è stata evidenziata a 21 giorni post-vaccinazione (DPV). Dopo l'infezione da challenge, si è verificata una sierconversione tardiva in tutti i gruppi a 21 DPI. Day 2: giorno 2 dopo l'arrivo nelle strutture di isolamento. Gruppo A: antigene ORF2 10,8 µg /dose. Gruppo B: antigene ORF2 3,6 µg /dose. Gruppo C: 1,2 µg di antigene ORF2/dose. Gruppo D: placebo (Guarneri et al., 2021b).

Per quanto riguarda gli anticorpi neutralizzanti, è stato effettuato prima uno *screening* dei sieri a 21 DPV. Inaspettatamente, tutti i sieri sono risultati positivi allo stesso titolo ( $\geq 1:16$ ). Successivamente, i titoli NA variavano tra 1:20 e  $\geq 1:40$ , senza differenze significative tra i gruppi. È stato inoltre controllato il numero di FFU (frazione non neutralizzata) al punto finale di ogni titolazione. Ancora una volta, nessuna differenza significativa tra i gruppi è stata rilevata da 21 DPV a 21 DPI. Al contrario, la frazione non neutralizzata era significativamente maggiore nel gruppo di controllo a 28 DPI ( $p = 0,029$ ); tale differenza era più pronunciata tra il gruppo di controllo e 1,2 µg (*test post Šidák*,  $p = 0,09$ , tendenza).

*Il vaccino Cap ha indotto scarsa risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di PCV2*

La risposta IFN- $\gamma$  specifica per PCV2 nei campioni di sangue intero sia al PCV2b inattivato che al Cap ricombinante è mostrata nella Tabella 17. La risposta IFN- $\gamma$  specifica del virione PCV2 a 21 DPV non differiva tra animali di controllo (immunità materna) e vaccinati in termini di prevalenza e altezza. Allo stesso tempo, il più alto carico utile di Ag (gruppo A, 10,8  $\mu$ m) ha indotto 3 reazioni positive su cinque all'antigene ORF2 ricombinante, rispetto agli altri gruppi in studio. Più importante, non è stata osservata alcuna risposta IFN- $\gamma$  specifica del virione PCV2 negli animali vaccinati dopo 21 DPV.

La risposta dell'IFN- $\gamma$  al PCV2 è stata ulteriormente valutata con il test di citometria a flusso per linfociti T positivi all'IFN- $\gamma$  in PBMC di tre maiali per gruppo. Il numero di risposte positive è stato calcolato in ogni momento per le cellule T CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  e  $\gamma/\delta$ , rispettivamente. Si è registrato un numero significativamente più alto di risposte nel gruppo D (controlli) a 21 DPV ( $p = 0,020$ ), così come nei gruppi B e D a 21 DPI ( $p = 0,023$ ). È stata osservata una completa soppressione delle risposte IFN- $\gamma$  in tutti i gruppi a 28 DPI.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti anche a test ELISPOT e FLUOROSPOT specifici per l'antigene ORF2 (Figura 40). In accordo con i risultati di cui sopra, sono state rivelate pochissime SC antigene specifiche per ORF2 per le 2 citochine oggetto di studio a 21 DPV, senza differenze significative tra animali vaccinati e di controllo. Una prevalenza significativamente maggiore è stata invece mostrata nel Gruppo A a 14 DPI ( $p=0.042$ ), rispetto a 21 e 28 DPI. All'interno dei quattro gruppi sperimentali, non è stata mostrata alcuna differenza significativa tra i diversi punti temporali (ANOVA per misure ripetute,  $p > 0,1$ ). Inoltre, non è stata osservata alcuna

risposta significativa specifica per Cap in termini di SC *double-positive* per IL-2/ IFN- $\gamma$  in qualsiasi momento.

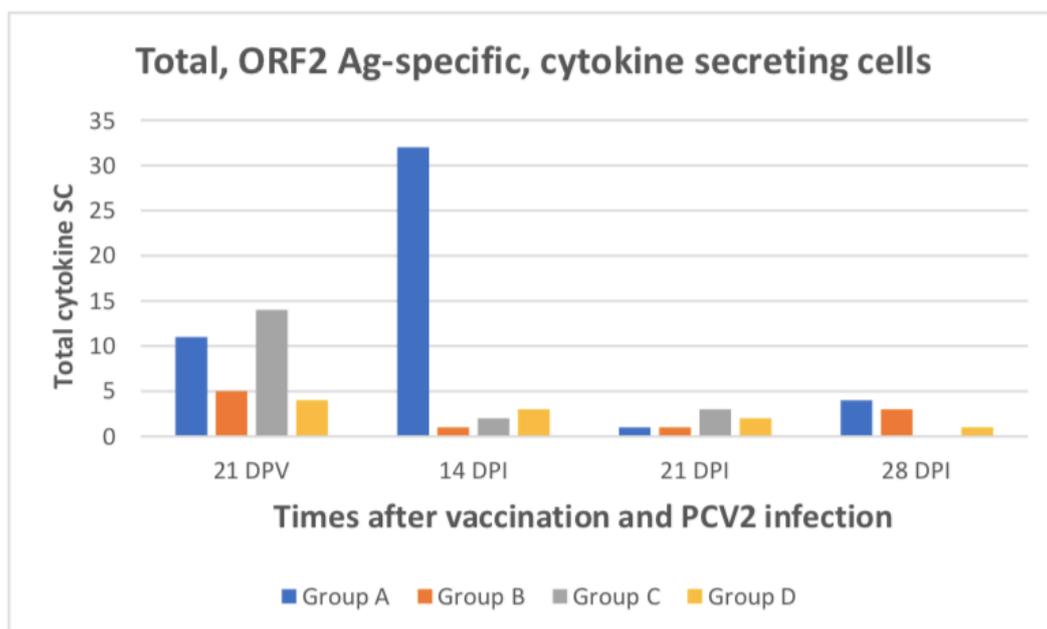


Figura 40. Saggio ELISPOT e FLUOROSPOT. Numero cumulativo TOTALE di ORF2 antigene-specifico, IFN- $\gamma$ , IL-2 e TFN- $\alpha$  SC /  $2 \times 10^5$  PBMC nei test ELISPOT (21 DPV, 14 e 21 DPI) e di IFN- $\gamma$  SC solo nei test fluorospot (28 DPI). I saggi ELISPOT e FLUOROSPOT sono stati eseguiti sugli stessi 3 suini/gruppo nei tempi indicati. Le differenze osservate a 14 DPI erano significative ( $p=0,042$ ). Gruppo A: 10,8  $\mu\text{g}$  di antigene ORF2/dose. Gruppo B: 3,6  $\mu\text{g}$  antigene ORF2/dose. Gruppo C: 1,2  $\mu\text{g}$  di antigene ORF2/dose. Gruppo D: placebo (Guarneri et al., 2021b).

Tabella 17. Risposta IFN  $\gamma$  in vitro dopo vaccinazione-infezione per PCV2. Campioni di sangue intero eparinizzato sono stati impiegati in un test di rilascio di IFN- $\gamma$  specifico per PCV2 per l'antigene ORF2 ricombinante (2  $\mu$ g/mL) e PCV2b inattivato, rispettivamente, in momenti diversi dopo la vaccinazione e l'infezione sperimentale. I risultati sono espressi in termini di  $\Delta$ (delta)mOD, ovvero la differenza di mOD tra i pozzetti stimolati con Ag e quelli di controllo. La tabella riporta i valori numerici di  $\Delta$ mOD. I campioni positivi e dubbi sono evidenziati utilizzando caratteri in grassetto. NEG: campione negativo al test ( $\Delta$ mOD < 10). Campioni dubbi:  $\Delta$ mOD  $\geq$  10, <20. Campioni positivi:  $\Delta$ mOD  $\geq$  20. \* Il maiale 057 è deceduto per polmonite al 5 DPV (Guarneri et al., 2021b).

Group D, Control IFN- $\gamma$ Response (Ag and DmOD)						Group C, 1.2 $\mu$ g ORF2 Ag/Dose IFN- $\gamma$ Response (Ag and DmOD)					
Pig	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28	Pig	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28
057 *	-	-	-	-	-	077	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 63</b> PCV2:NEG	<b>ORF2: 13</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
058	<b>ORF2: 58</b> <b>PCV2: 25</b>	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2: NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	078	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 16</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 46</b> PCV2:NEG
059	ORF2:NEG <b>PCV2: 23</b>	ORF2:NEG <b>PCV2: 17</b>	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	079	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
060	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 10</b> PCV2:NEG	080	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
076	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 22</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	100	ORF2:NEG <b>PCV2: 20</b>	ND	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 90</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
Group B, 3.6 $\mu$ g ORF2 Ag/dose IFN- $\gamma$ response (Ag and DmOD)						Group A, 10.8 $\mu$ g ORF2 Ag/dose IFN- $\gamma$ response (Ag and DmOD)					
Pig	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28	Pig	DPV 21	DPI 7	DPI 14	DPI 21	DPI 28
056	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 34</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	091	<b>ORF2: 29</b> PCV2:NEG	<b>ORF2: 17</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
092	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 10</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	095	<b>ORF2:64</b> PCV2:NEG	<b>ORF2: 56</b> PCV2:NEG	<b>ORF2: 42</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 16</b> PCV2:NEG
093	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	097	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2: 11 PCV2: 30	ORF2: 24 PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG
094	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 36</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	098	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 82</b> PCV2:NEG	<b>ORF2: 15</b> PCV2:NEG
096	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 12</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	099	<b>ORF2: 32</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	<b>ORF2: 17</b> PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG	ORF2:NEG PCV2:NEG

## Istologia

L'esame istologico non ha rilevato nessuna lesione indicativa di PCVD. I tessuti linfoidei hanno mostrato vari gradi di iperplasia. I valori medi e mediani dell'iperplasia nei tessuti linfoidei dei quattro gruppi sono riportati in Figura 41, senza variazioni significative tra i gruppi. La prova IHC per PCV2 ha rivelato l'assenza di antigene PCV2 in tutti i tessuti linfoidei in esame.

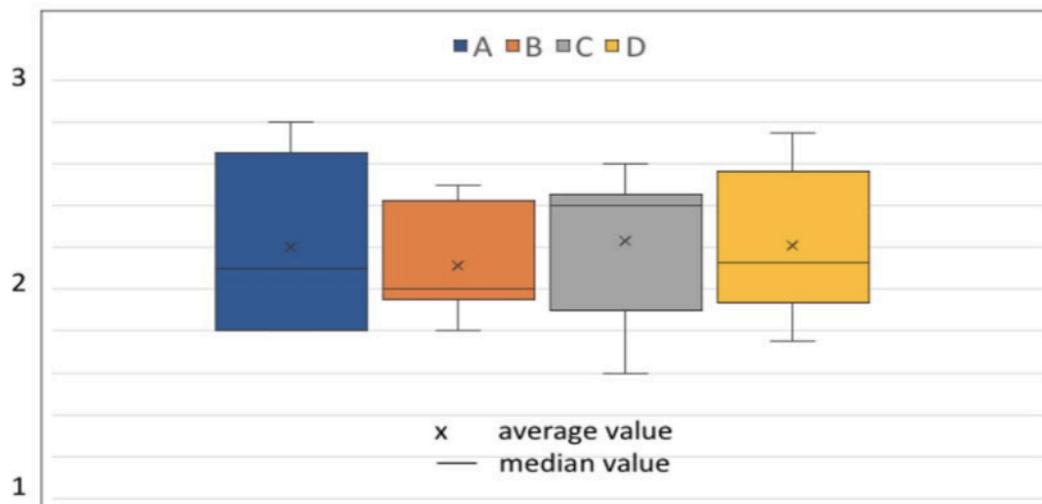


Figura 41. Classificazione dell'iperplasia nei tessuti linfoidei. In ogni riquadro sono riportati i valori medio (x) e mediano (linea) del grado di iperplasia in tutte le sezioni linfoidei (tonsille, milza, ileo, linfonodi mesenterici, mediastinici e inguinali superficiali) del relativo gruppo. I baffi indicano SD. Poiché i dati non sono normalmente distribuiti, la mediana è un indicatore migliore della distribuzione dei dati e in ciascun gruppo 1 e 3 sono i valori dell'intervallo di iperplasia (asse y), stimati come descritto in precedenza (Guarneri et al., 2021c). Gruppo A: 10,8  $\mu$ g di antigene ORF2/dose. Gruppo B: 3,6  $\mu$ g di antigene ORF2/dose. Gruppo C: 1,2  $\mu$ g di antigene ORF2/dose. Gruppo D: controllo (Guarneri et al., 2021b).

## 4.4 Discussione

L'utilizzo in campo della profilassi vaccinale per le PCVDs si è dimostrato efficace nel ridurre la prevalenza e la gravità di malattia legata al circovirus suino tipo 2. Nonostante l'alto tasso di mutazione del virus e le numerose variazioni antigeniche, i vaccini commerciali basati sul PCV2a mostrano una protezione crociata contro gli altri genotipi del PCV2 (Park et al., 2019). Nella Prova di vaccinazione 1, è stata

valutata l'efficacia e la potenza immunizzante di un vaccino-PCV2b a virus intero inattivato. I risultati ottenuti nella sperimentazione non depongono a favore di vaccini specifici per PCV2b. Infatti, confrontando i risultati con quelli ottenuti in un precedente studio sul PCV2a (Zanotti et al., 2015), è stata dimostrata una differenza di 4 volte nella potenza del vaccino tra i due vaccini genotipo-specifici: erano necessari 200 ng di PCV2a per una protezione completa contro il ceppo omologo, rispetto a 800 ng di PCV2b in questo studio.

Il secondo punto affrontato nello studio è stato la definizione dei correlati di protezione. Nel complesso, i risultati ottenuti non descrivono gli anticorpi come un robusto correlato di protezione. Innanzitutto, la viremia da PCV2 spesso coincideva con i picchi dei titoli anticorpali misurati mediante ELISA (Figura 34 E 35A). In secondo luogo, l'aumento dei titoli di anticorpi neutralizzanti non ha impedito la viremia nei suini infetti da PCV2. I titoli NA più importanti e moderati (1:4 – 1:8) prima del *challenge* sono stati osservati nei suini vaccinati sia protetti che non protetti (vedere Figura 34 e 35B). Tuttavia, è stato dimostrato che i titoli anticorpali medi sono significativamente influenzati dal carico utile di Ag del vaccino sperimentale PCV2b.

In accordo con i risultati di uno studio precedente (Zanotti et al., 2015), la risposta IFN- $\gamma$  a PCV2 su sangue intero è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione di tale risposta; tutti i suini IFN- $\gamma$ -positivi a 21 giorni dopo la vaccinazione erano completamente protetti contro la viremia post-*challenge*. Pertanto, questo test è sicuramente un robusto correlato di protezione nei suini vaccinati con vaccini PCV2 inattivati a virione intero. Questo risultato avvalorava l'ipotesi sull'importanza del ruolo proteggente della risposta cellulo-mediata

antigene-specifica in seguito ad infezione da PCV2 confermata già in studi precedenti: la *clearance* virale dipende dalla comparsa di cellule IFN- $\gamma$  specifiche per PCV2, prima ancora della comparsa degli anticorpi neutralizzanti PCV2 specifici (Fort et al., 2009; Steiner et al., 2009). Mentre anticorpi sierici possono essere riscontrati in alte percentuali in concomitanza della viremia e dell'escrezione virale (Sibila et al., 2004). Si conferma il risultato ottenuto da Koinig et al., (2015) secondo cui l'induzione di cellule produttrici IFN- $\gamma$  in seguito alla vaccinazione è associata ad una riduzione della viremia (Koinig et al., 2015).

Come previsto, nei tessuti non è stata rilevata alcuna lesione specifica per PCVD. La diversa prevalenza di istiociti reattivi e cellule giganti multinucleate nei tessuti linfoidi dei suini vaccinati potrebbe essere parte di una reazione antivirale, IFN- $\gamma$ -mediata, associata alla formazione di granuloma (Sharma e Bose, 2001), e probabilmente ridotta negli animali di controllo non vaccinati. Come possibile risultato di un campionamento tardivo, solo 3 campioni di tessuto dei gruppi di controllo (D) e 88 ng (C) erano positivi al PCV2 in IHC (Tabella 14): una bassa carica virale di partenza abbinata ad un tempo di prelievo dei campioni di tessuti per l'effettuazione delle tecniche di colorazione immunoistochimiche distante dall'ultima viremia, può aver contribuito al risultato ottenuto, che sarebbe quindi da verificare nelle condizioni di campo, molto diverse da quelle sperimentali soprattutto per la presenza di diversi cofattori e co-stressori microbiologici. Gli unici 3 soggetti risultati positivi per PCV2 all'IHC a livello di tessuti linfoidi erano quelli che avevano presentato una viremia più tardiva (al, o fino, al 35° giorno p.i.) (vedi Figura 34), mentre in tutti gli altri soggetti o la viremia non si è mai manifestata oppure essa si è risolta più precocemente e, quindi, temporalmente è risultata molto distante dalla data di soppressione (Tabella 13).

Dal 2006, i vaccini-PCV2 sono stati sviluppati e testati con successo sulla base del genotipo PCV2a. Tali vaccini si basano su particelle virali inattivate o sulla proteina ORF2 del capsido assemblata in *viral-like-particles* (VLP) (Segalés, 2015). Lo scopo della Prova di vaccinazione 2 è stato quindi quello di studiare le possibili proprietà immunizzanti della proteina ORF2 non assemblata per comprendere l'importanza della struttura del capsido di PCV2, a mezzo di un vaccino sperimentale ricombinante a base di proteina codificata da ORF2 di PCV2b. I risultati del lavoro mostrano che la proteina del capsido non assemblata non induce immunità protettiva nei suini, neanche a dosi molto più elevate rispetto ai vaccini convenzionali a virus intero e inattivati (abbastanza efficaci a dosi molto inferiori a 1 µg di antigene virionico) (Guarneri et al., 2021a; Zanotti et al., 2015).

I suini sono stati vaccinati a 37 giorni di età, rispetto ai 45 della sperimentazione 1 (Guarneri et al., 2021a). Contrariamente a quest'ultimo studio, i suini hanno mostrato livelli moderati di anticorpi neutralizzanti specifici per PCV2 al momento della vaccinazione, mentre i titoli ELISA erano nel *range* atteso. Pertanto, il rapporto tra anticorpi neutralizzanti ed ELISA era più alto di quanto precedentemente osservato nei suini della stessa età e *background* genetico. Di conseguenza, i suini hanno anche mostrato livelli moderati di immunità cellulo-mediata di origine materna, come descritto in studi precedenti (Ho et al., 2012; Salmon et al., 2009). Da notare che nell'allevamento di provenienza dei suinetti inclusi nello studio, quattro mesi prima della loro nascita si era verificata una parziale rottura dell'immunità al PCV2, che potrebbe aver implicato un trasferimento più pronunciato dell'immunità passiva nei mesi successivi. Questo aspetto è probabilmente correlato con l'insorgenza ritardata

della sieroconversione sia nei suinetti vaccinati che in quelli di controllo a 21 DPI. Tuttavia, sulla base dei dati pubblicati (Opriessnig et al., 2008), si prevede che i vaccini-PCV2 inducano un'immunità protettiva nonostante i moderati titoli di MDA al momento della vaccinazione. Non è stato questo il caso. Considerando che è stato dimostrato che 200-800 ng di virione intero con antigeni inattivati conferiscono una protezione completa per proteggere dall'infezione nei suini della stessa età e *background* genetico (Guarneri et al., 2021a; Zanotti et al., 2015), dosi molto più elevate di prodotto ORF2 libero e ricombinante al di fuori della struttura del capsido del virus non hanno conferito alcuna protezione significativa dopo il *challenge* sperimentale. Sulla base delle sequenze ORF2 sia del vaccino che del virus impiegato nel *challenge*, nessuna differenza di aminoacidi può spiegare la mancanza di immunità protettiva.

L'immunogenicità molto bassa del prodotto PCV2 ORF2 potrebbe essere correlata ad un ripiegamento inadeguato in soluzione e all'esposizione limitata di siti immunogenici al sistema immunitario dell'ospite. In pratica, è concepibile che il capsido libero e non assemblato non presenti adeguatamente epitopi conformazionali critici per la stimolazione del sistema immunitario. In aggiunta a ciò, la proteina probabilmente non riuscirebbe a indurre la presentazione incrociata di epitopi di cellule T attraverso MHC I per una risposta dei linfociti T citotossici (Colbert et al., 2020), che potrebbe invece realizzarsi accoppiando proteine virali a vettori adatti come *Heat Shock Proteins* (Tsan and Gao, 2009). Invece, le strutture del capsido del virione e del VLP potrebbero essere direttamente adatte alla presentazione incrociata attraverso MHC I, in accordo con i dati della letteratura (Grgacic et al., 2006; Ludwig and Wagner, 2007). A questo proposito, la presentazione incrociata di peptidi virali

può essere fondamentale per la risposta immunitaria protettiva indotta dal virione intero e dai vaccini VLP di PCV2.

Inoltre, nello studio è stata osservata una chiara discrepanza (Tabella 17) tra le risposte IFN- $\gamma$  all'intero virione PCV2 e al prodotto ORF2, rispettivamente, che può implicare la mancanza di presentazione incrociata di epitopi importanti alle cellule T citotossiche CD8 $\beta$  dopo la vaccinazione con antigene ORF2 ricombinante non assemblato.

In questo quadro concettuale, l'incapacità del prodotto ORF2 non assemblato di indurre una risposta IFN- $\gamma$  in vitro al virione PCV2 completamente inattivato è stato il principale marcatore immunologico in questo studio, poiché questo tipo di risposta è identificata come principale correlato di protezione nel modello di *challenge* vaccinazione e infezione PCV2 (Guarneri et al., 2021a; Zanotti et al., 2015).

Come previsto, nei tessuti non sono state rilevate né lesioni macroscopiche specifiche per PCVD né lesioni microscopiche, e inaspettata è stata l'assenza di una carica virale rilevabile almeno nei gruppi di controllo e nel gruppo C, che ha ricevuto il vaccino con il carico utile di antigene più basso. La probabile spiegazione dell'assenza di PCVDs è l'assenza nello studio sperimentale di altri co-fattori infettivi e non, necessari al loro sviluppo dopo l'infezione da PCV2 (Opriessnig and Halbur, 2012), anche senza l'immunità protettiva associata al vaccino. Per quanto riguarda il mancato rilevamento di una carica virale nei tessuti linfoidi mediante immunoistochimica, i risultati possono essere interpretati come conseguenza dei moderati titoli di anticorpi neutralizzanti prima dell'inizio della sperimentazione. Forse erano responsabili di una ridotta capacità del virus di entrare nelle cellule; ciò comporterebbe

quantità non rilevabili di PCV2 negli organi bersaglio mediante immunoistochimica, indipendentemente dagli alti livelli di viremia, come riportato in studi precedenti (Fort et al., 2007; Solis Worsfold et al., 2015).

## 4.5 Conclusioni

In conclusione, i risultati ottenuti nella prima prova di vaccinazione con vaccino sperimentale intero inattivato per PCV2 non supportano le proposte per lo sviluppo di vaccini specifici per PCV2b. I dati confermano che il test di rilascio di IFN- $\gamma$  specifico per PCV2 su campioni di sangue intero può essere uno strumento valido per valutare l'efficacia dei vaccini PCV2 inattivati con virione intero. Quest'ultima risposta è stimolata dalla vaccinazione contro il PCV2 e non dall'infezione. Inoltre, i suini rispondono a un vaccino PCV2b e alla successiva infezione sperimentale con titoli anticorpali e risposte delle cellule T proporzionali alle dosi di antigene PCV2.

Nella seconda prova di vaccinazione è stato impiegato un vaccino ricombinante a base di proteina ORF2 di PCV2. I risultati ottenuti non hanno rivelato alcuna sostanziale immunogenicità dell'antigene PCV2 codificato da ORF2 al di fuori della struttura del capsido del virus. In particolare, il prodotto ORF2 isolato ha dato origine a risposte immunitarie cellulo-mediate e anticorpali molto scarse al PCV2, che non potevano essere discriminate dai profili di immunità passiva. Inoltre, i vaccini basati sull'antigene codificato da ORF2 non sono riusciti a indurre una risposta IFN- $\gamma$  specifica del virione PCV2 nei campioni di sangue intero, un marcatore come già riferito essere un robusto correlato di protezione dopo l'iniezione di vaccini-PCV2 inattivati con virione intero.

## Bibliografia

- Afghah, Z., Webb, B., Meng, X. J., & Ramamoorthy, S., 2017. Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: is eradication a possibility? *Veterinary microbiology* 206, 21–28.
- Alarcon, P., Rushton, J., Nathues, H., & Wieland, B., 2013. Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Preventive veterinary medicine* 110, 103–118
- Alarcon, P., Velasova, M., Mastin, A., Nevel, A., Stark, K.D., Wieland, B., 2011. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Preventive veterinary medicine* 101, 182–191.
- Chae, C., 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal* 194, 151–157.
- Chae, C., 2016. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Journal* 212, 1–6.
- Colbert, J. D., Cruz, F. M., Rock, K. L., 2020. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. *Current opinion in immunology* 64, 1–8.
- Constans, M., Ssemadaali, M., Kolyvushko, O., Ramamoorthy, S., 2015. Antigenic Determinants of Possible Vaccine Escape by Porcine Circovirus Subtype 2b Viruses. *Bioinformatics and biology insights* 9(Suppl 2), 1–12.
- Dvorak, C. M., Payne, B. J., Seate, J. L., Murtaugh, M. P., 2018. Effect of maternal antibody transfer on antibody dynamics and control of porcine circovirus type 2 infection in offspring. *Viral immunology* 31, 40–46.
- Dvorak, C. M., Yang, Y., Haley, C., Sharma, N., Murtaugh, M. P., 2016. National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Veterinary microbiology* 189, 86–90.
- Ellis, J., 2014. Porcine circovirus: a historical perspective. *Veterinary pathology* 51, 315–327.

- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary microbiology* 125, 244–255.
- Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063–1071.
- Fort, M., Sibila, M., Nofrarías, M., Pérez-Martín, E., Olvera, A., Mateu, E., Segalés, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 137, 226–234.
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031–4037.
- Fraile, L., Grau-Roma, L., Sarasola, P., Sinovas, N., Nofrarías, M., López-Jimenez, R., López-Soria, S., Sibila, M., Segalés, J., 2012. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine* 30, 1986–1992.
- Grgacic, E.V.; Anderson, D.A., 2006. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* 40, 60–65.
- Guarneri, F., Tonni, M., Sarli, G., Boniotti, M.B., Lelli, D., Barbieri, I., D'Annunzio, G., Alborali, G.L., Bacci, B., Amadori, M., 2021b. Non-Assembled ORF2 Capsid Protein of Porcine Circovirus 2b Does Not Confer Protective Immunity. *Pathogens* 10, 1161.
- Guarneri, F., Tresoldi, E.T., Sarli, G., Boniotti, M.B., Lelli, D., Barbieri, I., Bacci, B., D'Annunzio, G., Amadori, M., 2021a. Protective immunity in swine induced by Porcine Circovirus 2b inactivated vaccines with different antigen payload. *Veterinary Microbiology* 252, 108887.
- Guarneri, F., Tresoldi, E.T., Sarli, G., Boniotti, M.B., Lelli, D., Barbieri, I., Bacci, B., D'Annunzio, G., Amadori, M., 2021c. Dataset of immune responses induced in swine by an inactivated Porcine Circovirus 2b vaccine. *Data in Brief* 35, 106906.

- Harmon, K.M., Gauger, P.C., Zhang, J., Pineyro, P.E., Dunn, D.D., Chriswell, A.J., 2015. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States. *Genome announcements* 3, e01315–15.
- Karuppanan, A., Opriessnig, T., 2017. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. *Viruses* 9, 99.
- Kekarainen, T., Segalés, J., 2015. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine health management* 1, 17.
- Koinig, H. C., Talker, S. C., Stadler, M., Ladinig, A., Graage, R., Ritzmann, M., Hennig-Pauka, I., Gerner, W., Saalmüller, A., 2015. PCV2 vaccination induces IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  co-producing T cells with a potential role in protection. *Veterinary research* 46, 20.
- Koinig, H. C., Talker, S. C., Stadler, M., Ladinig, A., Graage, R., Ritzmann, M., Hennig-Pauka, I., Gerner, W., Saalmüller, A., 2015. PCV2 vaccination induces IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  co-producing T cells with a potential role in protection. *Veterinary research* 46, 20.
- Kurmann, J., Sydler, T., Brugnera, E., Buergi, E., Haessig, M., Suter, M., Sidler, X., 2011. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-05183.
- Ludwig, C., Wagner, R., 2007. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current opinion in biotechnology* 18, 537–545.
- Martelli, P., Ardigò, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Luppi, A., Guazzetti, S., Caleffi, A., Borghetti, P., 2013. Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Veterinary microbiology* 162, 558–571.
- Oh, Y., Seo, H. W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2012. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *The Journal of general virology* 93, 1556–1562.
- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and

nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of virological methods* 117, 75–80.

- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clinical and vaccine immunology* 15, 397–401.
- Opriessnig, T., Halbur, P. G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus research* 164, 20–32.
- Opriessnig, T., Madson, D. M., Prickett, J. R., Kuhar, D., Lunney, J. K., Elsener, J., & Halbur, P. G., 2008b. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Veterinary microbiology* 131, 103-114.
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Elsener, J., Meng, X. J., Halbur, P. G., 2008a. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 397–401
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Madson, D. M., Pal, N., Halbur, P. G., 2009a. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV–PCV2–SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination. *Vaccine* 27, 1002–1007.
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Madson, D. M., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., Halbur, P. G., 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Veterinary microbiology* 142, 177–183.
- Park, C., Oh, Y., Seo, H. W., Han, K., Chae, C., 2013. Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-00497.
- Park, K.H.; Oh, T.; Yang, S.; Cho, H.; Kang, I.; Chae, C. 2019. Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. *Veterinary Microbiology* 231, 87–92

- Pejsak, Z., Kusior, G., Pomorska-Mól, M., Podgórska, K., 2012. Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. *Polish journal of veterinary sciences* 15, 37–42.
- Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., Stadejek, T., 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 33, e1-e5.
- Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C. R., Abrahante, J., Jimenez, L. G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, M. P., 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus research* 157, 92–98.
- Razzuoli, E., Faggionato, E., Dotti, S., Villa, R., Lombardo, T., Boizza, L., Ferrari, M., Amadori, M., 2012. Isolation and culture of pig tonsil lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 148, 320–325.
- Sala, G., Rigola, S., Alborali, G.L., Brocchi, E., Cordioli, P., 2000. Development of monoclonal antibodies-based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2, in: *Proceedings of the 5th International Congress of Veterinary Virology, Brescia, Italy, 27–30 August 2000*; 253–254.
- Salmon, H., Berri, M., Gerdtts, V., Meurens, F., 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and comparative immunology*, 33, 384–393.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research* 164, 10–9.
- Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert review of vaccines* 14, 473–487.
- Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *The Veterinary record* 162, 867–868.
- Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarías, M., López-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H. J., 2009. A genetically engineered

- chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27, 7313–7321.
- Seo, H. W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2014b. Clinical, virological, immunological and pathological evaluation of four porcine circovirus type 2 vaccines. *The Veterinary Journal* 200, 65–70.
- Seo, H. W., Lee, J., Han, K., Park, C., Chae, C., 2014a. Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines. *Research in veterinary science* 97, 38–42.
- Sharma, S., & Bose, M., 2001. Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 19, 213.
- Shen, H., Wang, C., Madson, D. M., Opriessnig, T., 2010. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Preventive veterinary medicine* 97, 228–236.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A., Domingo, M., 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American journal of veterinary research* 65, 88–92.
- Solis Worsfold, C., Dardari, R., Law, S., Eschbaumer, M., Nourozieh, N., Marshall, F., Czub, M., 2015. Assessment of neutralizing and non-neutralizing antibody responses against Porcine circovirus 2 in vaccinated and non-vaccinated farmed pigs. *The Journal of general virology* 96, 2743–2748.
- Steiner, E. Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC veterinary research* 5, 45.
- Tsan, M. F., Gao, B., 2009. Heat shock proteins and immune system. *Journal of leukocyte biology* 85, 905–910.
- Velasova, M., Alarcon, P., Werling, D., Nevel, A., Wieland, B., 2013. Effectiveness of porcine circovirus type 2 vaccination in reducing the severity of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *The Veterinary Journal* 197, 842–847.

- Welter, A., Sundararaman, S., Li, R., Zhang, T., Karulin, A.Y., Lehmann, A., Naeem, V., Roen, D.R., Kuerten, S., Lehmann, P.V., 2018. High-Throughput GLP-Capable Target Cell Visualization Assay for Measuring Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cells* 7, 35.
- Xiao, C. T., Halbur, P. G., Opriessnig, T., 2012. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *Journal of Virology* 86, 12469.
- Xiao, C. T., Halbur, P. G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *Journal of General Virology* 96, 1830–1841.
- Young, M. G., Cunningham, G. L., Sanford, S. E., 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production* 19, 175–180.
- Zanotti, C., Martinelli, N., Lelli, D., Amadori, M., 2015. Correlates of Protection Following Vaccination with Inactivated Porcine Circovirus 2 Vaccines. *Viral immunology* 28, 600–608.