



# **Stage presso il Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA) di Barcellona:**

## **L'impiego di istopatologia ed immunoistochimica in patologia suina**

Dott.ssa Giorgia De Lorenzi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Pavia



# Il Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA) è...



- un centro di ricerca facente parte dell'IRTA, un Istituto che si occupa di ricerca e tecnologia agroalimentare
- La ricerca è focalizzata su tre aree:
  - 1) Malattie endemiche
  - 2) Malattie esotiche
  - 3) Epidemiologia e valutazione del rischio
- collabora l'Università Autonoma di Barcellona (UAB)





# Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA)



★ Campus UAB Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spagna

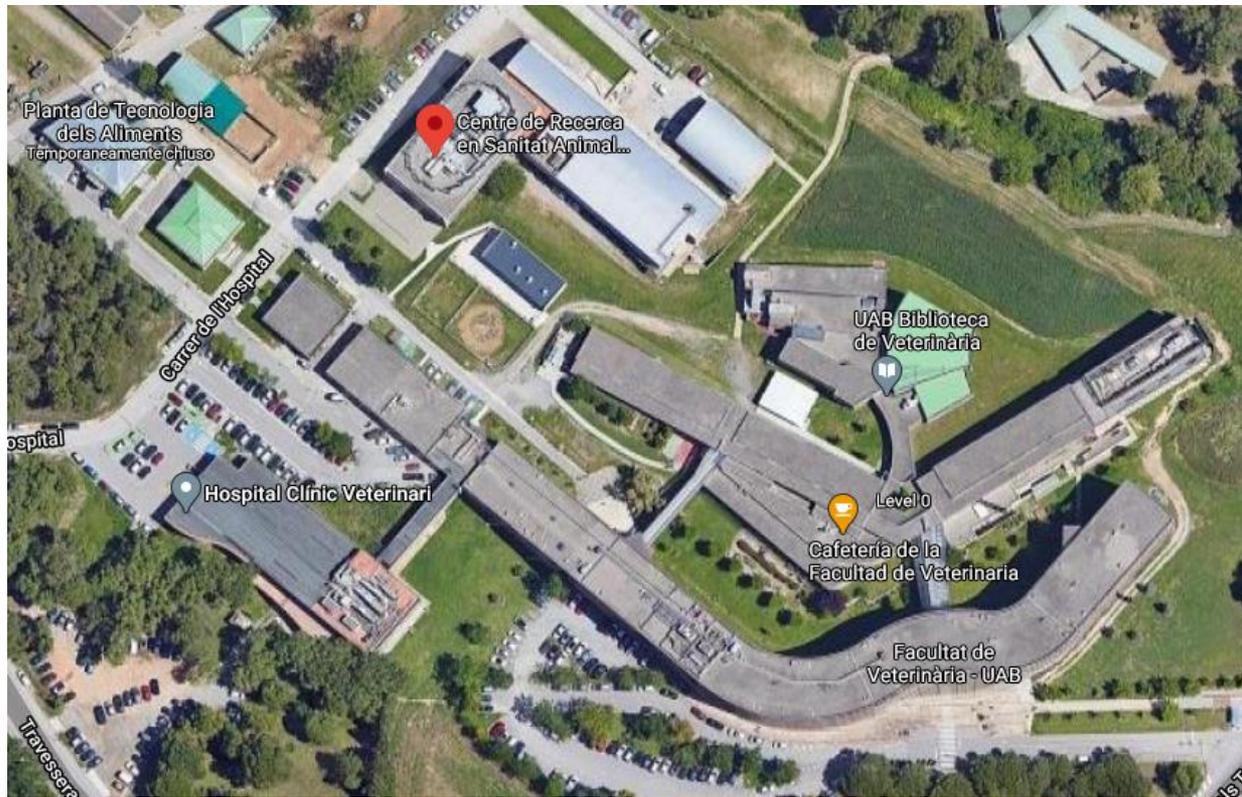




# Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA)



★ Campus UAB Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spagna





# La scelta dell'IRTA-CReSA



- **Periodo di stage: 17 giugno al 12 luglio 2019**
- **La proposta di svolgere lo stage presso IRTA-CReSA nasce perché:**
  - Sono centri di riferimento nella ricerca e nella diagnostica delle malattie del suino a livello nazionale e internazionale
  - Sono gli unici centri in Spagna in cui istopatologia e immunoistochimica (IHC) vengono utilizzate sia a scopo di ricerca che nella diagnostica di routine



# Obiettivi dello stage e principali attività svolte



- Approfondire le mie conoscenze riguardo i metodi diagnostici morfologici basati sulla valutazione delle lesioni anatomopatologiche in corso di necroscopie
- Apprendere gli esami di laboratorio *Gold standard* e complementari utilizzati nella diagnosi delle principali malattie infettive del suino
- Apprendere i criteri su cui si basa l'indagine istopatologica ed immunohistochimica nel suino
- Gestione e preparazione dei campioni per lo svolgimento dell'esame istologico
- Acquisizione di basi per la lettura di preparati istologici
- Conoscere le principali tecniche immunohistochimiche utilizzate nella diagnosi delle malattie infettive del suino



# Risultati



# 1 - Esami di laboratorio svolti per la diagnosi delle principali malattie infettive del suino



Malattia	Campione di elezione	Gold standard	Esami complementari	Osservazioni
PCV2-SD	Tessuto linfatico	Istopatologia + IHC	Non eseguiti	-
PRRS	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR	IHC	RT-PCR è più sensibile rispetto a IHC
Influenza suina	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR	IHC	
Streptococcosi	Cervello	Istopatologia + batteriologico	Non eseguiti	-
Malattia respiratoria batterica	Turbinati, polmoni	Istopatologia + batteriologico	Non eseguiti	-
Enteropatia proliferativa ( <i>Lawsonia intracellularis</i> )	Ileo (valvola ileo-ciecale)	Istopatologia + Col. di Warthin-Starry + IHC	Non eseguiti	PCR dalle feci è utile per individuare animali infetti ma non per fare diagnosi di malattia
Colibacillosi	Piccolo intestino	Batteriologico+ PCR	Istopatologia	Animali sotto trattamento possono risultare negativi al batteriologico
Clostridiosi ( <i>C. difficile</i> )	Grosso intestino	Istopatologia	Batteriologico + PCR	L'esame batteriologico da solo è insufficiente perchè i clostridi proliferano rapidamente dopo la morte
Clostridiosi ( <i>C. perfringens</i> tipo A e tipo C)	Piccolo intestino (digiuno)	Batteriologico + PCR	Istopatologia	
Dissenteria emorragica e Spirochetosi ( <i>Brachyspira</i> spp.)	Colon	Batteriologico + PCR	Istopatologia + Col. di Warthin-Starry	Animali sotto trattamento possono risultare negativi al batteriologico
PED	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR	Non eseguiti	Il virus può scomparire rapidamente in animali guariti
Rotavirosi	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR	Non eseguiti	
Coccidiosi	Piccolo intestino	Istopatologia + flottazione	Non eseguiti	Le oocisti non si trovano nelle feci nella fase acuta della malattia. anche le feci formate possono essere positive
Trichiuriasi	Grosso intestino	Flottazione + parassiti evidenti nelle feci	Non eseguiti	-



# 1 - Esami di laboratorio svolti per la diagnosi delle principali malattie infettive del suino



Malattia	Campione di elezione	Gold standard	Esami complementari	Osservazioni	
PCV2-SD	Tessuto linfatico	Istopatologia + IHC		<p><b>Istopatologia è tra i test di prima scelta</b> nella diagnosi delle principali:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>forme neurologiche</b> (Streptococcosi)</li> <li>• <b>forme enteriche</b> (<i>C. difficile</i>, PED, Rotavirus)</li> </ul>	
PRRS	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR			
Influenza suina	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR			
Streptococcosi	Cervello	Istopatologia + batteriologico			
Malattia respiratoria batterica	Turbinati, polmoni	Istopatologia + batteriologico			
Enteropatia proliferativa ( <i>Lawsonia intracellularis</i> )	Ileo (valvola ileo-ciecale)	Istopatologia + Col. di Warthin-Starry + IHC			
Colibacillosi	Piccolo intestino	Batteriologico+ PCR			
Clostridiosi ( <i>C. difficile</i> )	Grosso intestino	Istopatologia			
Clostridiosi ( <i>C. perfringens</i> tipo A e tipo C)	Piccolo intestino (digiuno)	Batteriologico + PCR			
Dissenteria emorragica e Spirochetosi ( <i>Spirillum spp.</i> )	Colon	Batteriologico + PCR			
PED	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR		<p><b>Istopatologia e IHC sono test di prima scelta</b> nella diagnosi di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PCV2-SD</b></li> <li>• <b>Enteropatia proliferativa (<i>L. intracellularis</i>)</b></li> </ul>	
Rotavirosi	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR			
Coccidiosi	Piccolo intestino	Istopatologia + flottazione	Non eseguiti		Le oocisti non si trovano nelle feci nella fase acuta della malattia. anche le feci formate possono essere positive
Trichiuriasi	Grosso intestino	Flottazione + parassiti evidenti nelle feci	Non eseguiti		-





# 1 - Esami di laboratorio svolti per la diagnosi delle principali malattie infettive del suino



Malattia	Campione di elezione	Gold standard	Esami complementari	Osservazioni
PCV2-SD	Tessuto linfatico	Istopatologia + IHC	Non eseguiti	-
<b>PRRS</b>	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR	IHC	RT-PCR è più sensibile rispetto a IHC
<b>Influenza suina</b>	Polmoni	Istopatologia + RT-PCR	IHC	
Streptococcosi	Cervello	Istopatologia + batteriologico	Non eseguiti	-
Malattia respiratoria batterica	Turbinati			-
Enteropatia proliferativa ( <i>Lawsonia intracellularis</i> )	Ileo (vicino al cieco)			È utile per individuare animali per fare diagnosi di malattia
Colibacillosi	Piccolo intestino			In trattamento possono risultare negativi al batteriologico
Clostridiosi ( <i>C. difficile</i> )	Grosso intestino			Batteriologico da solo è insufficiente perché proliferano rapidamente dopo la morte
Clostridiosi ( <i>C. perfringens</i> tipo A e tipo C)	Piccolo intestino (digiuno)			
Dissenteria emorragica e spirochetosi ( <i>Brachyspira</i> spp.)	Colon			In trattamento possono risultare negativi al batteriologico
PED	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR	Non eseguiti	Il virus può scomparire rapidamente in animali guariti
Rotavirosi	Piccolo intestino	Istopatologia + RT-PCR	Non eseguiti	
Coccidiosi	Piccolo intestino	Istopatologia + flottazione	Non eseguiti	Le oocisti non si trovano nelle feci nella fase acuta della malattia. anche le feci formate possono essere positive
Trichiuriasi	Grosso intestino	Flottazione + parassiti evidenti nelle feci	Non eseguiti	-

**Nelle malattie respiratorie:**

- **Istopatologia è tra i test di prima scelta**
- **IHC è un test complementare sempre raccomandato**

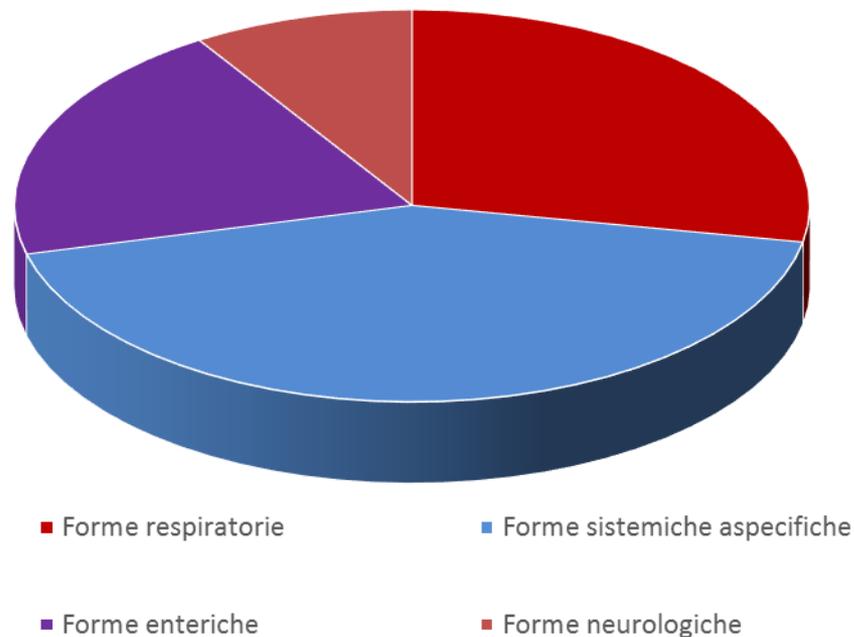




## 2 - Valutazione retrospettiva delle necropsie svolte presso UAB nel 2018:



- 180 conferimenti
- Sintomi in anamnesi:
  - 43% casi di scarso accrescimento e deperimento
  - 28 % forme respiratorie
  - 20 % forme enteriche
  - 9 % forme neurologiche
- Frequenza di utilizzo di istologia e IHC:
  - **Istologia: 100% dei casi**
  - **IHC: 70% dei casi**

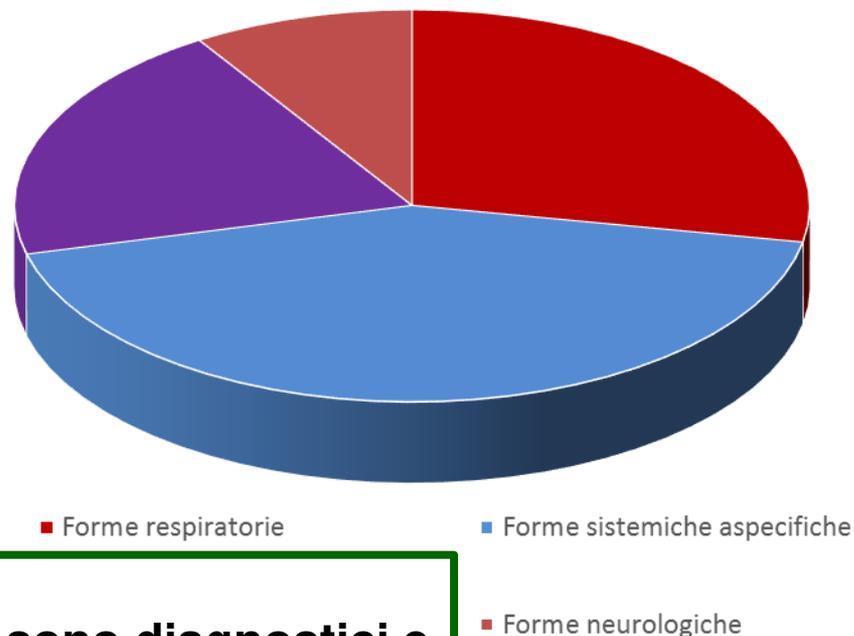




## 2 - Valutazione retrospettiva delle necropsie svolte presso UAB nel 2018:



- 180 conferimenti
- Sintomi in anamnesi:
  - **43% casi di scarso accrescimento e deperimento**
  - 28 % forme respiratorie
  - 20 % forme enteriche



**Gli animali cronici in molti casi non sono diagnostici e non dovrebbero essere utilizzati per la diagnosi.**

**L'istopatologia in animali cronici tuttavia può indirizzare verso una diagnosi morfologica più precisa**



# **Casi Clinici seguiti durante il periodo di stage...**



# Caso Clinico 1



- Sito 1 in Catalogna
- Sintomi: diarrea in suinetti di 1 giorno di vita e scarso accrescimento
- Morbilità del 70%
- Mortalità del 20%
- Scrofe vaccinate per *E. coli* enterotossigeni, *C. perfringens* tipo A
- Scrofette vaccinate per Rotavirus tipo A

## **Esame necroscopico:**

Suinetti disidratati

Feci giallastre nella regione perineale

Stomaco vuoto



# Caso Clinico 1



Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Piccolo intestino	Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	E. coli
		Semina su Agar globuli incubato a 37 gradi per 48 ore in anaerobiosi	Negativo
PCR multiplex E. coli ETEC	Colonia batterica	Rilevazione della presenza di geni codificanti fimbrie e tossine	Negativa
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA virale	Negativa
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di RNA virale	Negativa
Istologia	Polmone, rene, milza, intestino, colon, fegato, cervello, tonsilla palatina, muscolo scheletrico	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	<b>Piccolo intestino: lieve atrofia e fusione dei villi; vacuolizzazioni degli enterociti</b>



# Caso Clinico 1



Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale		Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	E. coli
PCR multiplex E. coli ETEC			Negativo
RT-PCR Coronavirus			Negativa
RT-PCR Rotavirus			Negativa
Istologia			<b>Piccolo intestino: lieve atrofia e fusione dei villi; vacuolizzazioni degli enterociti</b>



# Caso Clinico 1

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Piccolo intestino	Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	E. coli
		Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	Negativo
PCR multiplex E. coli ETEC	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di fimbrie e	Negativa
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA virale	Negativa
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di RNA virale	Negativa
Istologia	Piccolo intestino	Esame istopatologico dei tessuti intestinali	<b>Piccolo intestino: lieve atrofia e fusione dei villi; vacuolizzazioni degli enterociti</b>

Gli esami di laboratorio hanno permesso di escludere cause infettive di diarrea neonatale

L'esame istopatologico suggerisce cause di tipo manageriale, disgalassia post partum, inanizione

**Piccolo intestino: lieve atrofia e fusione dei villi; vacuolizzazioni degli enterociti**



## Caso clinico 2



- Sito 1 in Catalogna
- Sintomi: diarrea in suinetti di 3 giorni di vita
- Morbilità 80 %
- Mortalità 50%
- Scrofe vaccinate per *E. coli* enterotossigeni e *C. perfringens* tipo C

### **Esame necroscopico:**

Suinetti disidratati

Stomaco repleto di latte coagulato

Dilatazione e congestione del piccolo intestino

Contenuto intestinale giallo-verde



## Caso clinico 2



Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Piccolo intestino	Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	<b>E. coli</b>
		Semina su Agar globuli incubato a 37 gradi per 48 ore in anaerobiosi	<b>Clostridium perfringens tipo A</b>
PCR multiplex E. coli ETEC	Colonia batterica	Rilevazione della presenza di geni codificanti fimbrie e tossine	<b>E. coli F4 EAST-1</b>
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA virale	Negativa
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di RNA virale	<b>Positiva</b>
Istologia	Polmone, rene, milza, intestino, colon, fegato, cervello, tonsilla palatina, muscolo scheletrico	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	<b>Piccolo intestino: atrofia e severa fusione dei villi. Villi marcatamente appiattiti. Presenza di moderata quantità di coccobacilli attaccati agli enterociti</b>



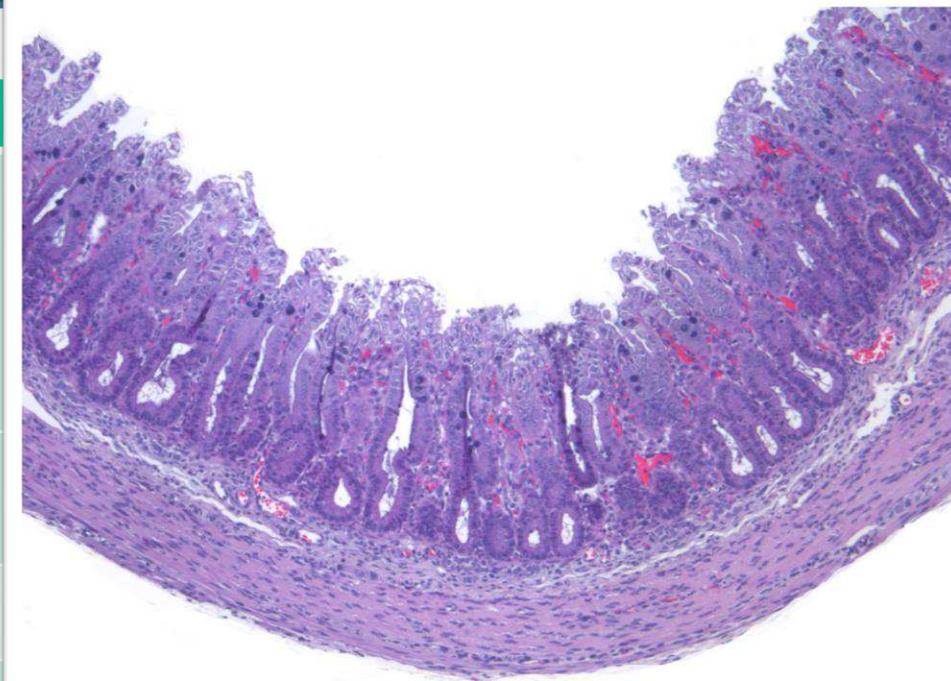
## Caso clinico 2



Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Piccolo intestino	Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	<b>E. coli</b>
		Semina su Agar globuli incubato a 37 gradi per 48 ore in anaerobiosi	<b>Clostridium perfringens tipo A</b>
PCR multiplex E. coli ETEC	Colonia batterica	Rilevazione della presenza di geni codificanti fimbrie e tossine	<b>E. coli F4 EAST-1</b>
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA virale	Negativa
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di RNA virale	<b>Positiva</b>
Istologia	Polmone, rene, milza, intestino, colon, fegato, cervello, tonsilla palatina, muscolo scheletrico	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	<b>Piccolo intestino: atrofia e severa fusione dei villi. Villi marcatamente appiattiti. Presenza di moderata quantità di coccobacilli adesi agli enterociti</b>



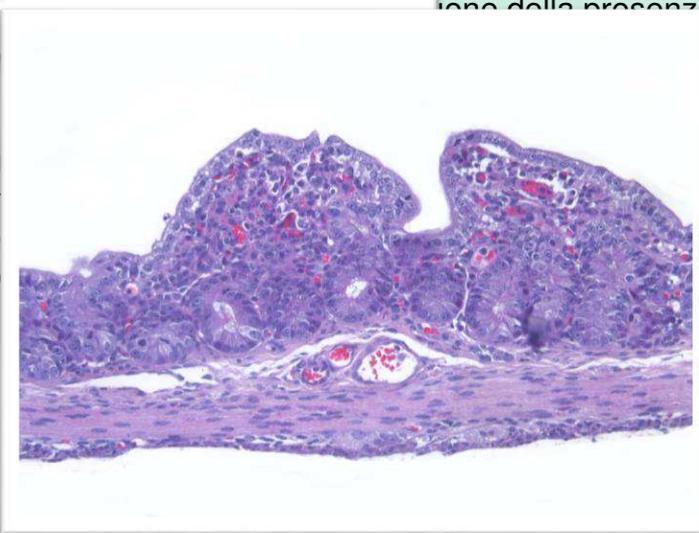
# Caso clinico 2



	Resultati
... su Agar globuli o a 37 °C per 48 erobiosi	<b>E. coli</b>
... su Agar globuli o a 37 gradi per 48 naerobiosi	<b>Clostridium perfringens tipo A</b>
...ione della presenza codificanti fimbrie e	<b>E. coli F4 EAST-1</b>
...ione della presenza A virale	Negativa
...ione della presenza	<b>Positiva</b>

Istologia

Polmo  
intestir  
cervell  
musco



**Positiva**

**Piccolo intestino: atrofia  
e severa fusione dei villi.  
Villi marcatamente  
appiattiti. Presenza di  
moderata quantità di  
coccobacilli adesi agli  
enterociti**



# Caso clinico 2



Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
		Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	<b>E. coli</b>
<p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 2973–2979  0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00809-08  Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.</p> <p><b>Detection and Characterization of Group C Rotaviruses in Asymptomatic Piglets in Ireland<sup>∇</sup></b>  P. J. Collins,<sup>1</sup> V. Martella,<sup>2</sup> and H. O’Shea<sup>1*</sup></p>			<p>Vol. 46, No. 9</p> <p><b>m perfringens</b></p> <p><b>EAST-1</b></p>
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza dell’RNA virale	Negativa
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	Rilevazione della presenza di RNA virale	<b>Positiva</b>
Istologia	Polmone, rene, milza, intestino, colon, fegato, cervello, tonsilla palatina, muscolo scheletrico	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	<b>Piccolo intestino: atrofia e severa fusione dei villi. Villi marcatamente appiattiti. Presenza di moderata quantità di coccobacilli attaccati agli enterociti</b>



## Caso clinico 2

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
		Semina su Agar globuli incubato a 37 °C per 48	E. coli
		<p>Arch Virol (2010) 155:1247–1259 DOI 10.1007/s00705-010-0713-1</p> <p>ORIGINAL ARTICLE</p> <p><b>Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland</b></p> <p>P. J. Collins,<sup>1</sup> V. Martella · R. D. Sleator · S. Fanning · H. O'Shea</p>	
RT-PCR Coronavirus	Piccolo intestino		
RT-PCR Rotavirus A	Piccolo intestino	di RNA virale	
Istologia	Polmone, rene, milza, intestino, colon, fegato, cervello, tonsilla palatina, muscolo scheletrico	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	<b>Piccolo intestino: atrofia e severa fusione dei villi. Villi marcatamente appiattiti. Presenza di moderata quantità di coccobacilli attaccati agli enterociti</b>

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 2973–2979  
0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00809-08  
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

**Detection and Characterization of Group A Rotavirus in Asymptomatic Piglets in Southern Ireland**  
P. J. Collins,<sup>1</sup> V. Martella · R. D. Sleator · S. Fanning · H. O'Shea

**Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland**

P. J. Collins · V. Martella · R. D. Sleator · S. Fanning · H. O'Shea

**Piccolo intestino: atrofia e severa fusione dei villi. Villi marcatamente appiattiti. Presenza di moderata quantità di coccobacilli attaccati agli enterociti**





**Per concludere...**

## ...take home messages



➔ Istopatologia e IHC sono esami di laboratorio *Gold standard* e complementari nella diagnosi delle principali malattie infettive del suino

➔ L'istopatologia permette di formulare la diagnosi osservando le lesioni provocate da uno o più patogeni:

Diagnosi di malattia vs Presenza dell'agente eziologico

➔ L'istopatologia permette di osservare lesioni in animali cronici, che possono indirizzare alla diagnosi

➔ L'IHC consente di valutare i dettagli delle cellule infette e la localizzazione dell'agente eziologico nella sezione di tessuto

➔ Considerando l'importanza di questi strumenti diagnostici sarebbe importante rendere questi test parte della routine diagnostica



**Grazie per l'attenzione!**