

**STUDIO DELLE MANIFESTAZIONI CLINICHE, DELLE
MODIFICAZIONI ANATOMICHE E DEL PATTERN
INFIAMMATORIO CITOCHINICO NEL LIQUIDO
BRONCO-ALVEOLARE IN SUINI AFFETTI DA MALATTIA
RESPIRATORIA ACUTA SPONTANEA DA ACTINOBACILLUS
PLEUROPNEUMONIAE: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE**

***STUDY ON THE CLINICAL SIGNS, THE ANATOMIC CHANGES
AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE PATTERN IN
BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUIDS OF PIGS SUFFERING
FROM SPONTANEOUS ACUTE RESPIRATORY DISEASE
CAUSED BY ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE AND
THERAPEUTIC IMPLICATIONS***

P. ARDIGÒ¹, L. FERRARI¹, M. MORGANTI¹, E. DE ANGELIS¹, A. LUPPI²,
Y. GHERPELLI², G. MERIALDI³, A. VOLTA¹, G. GNUDI¹, R. SALERI⁴,
P. BORGHETTI¹, P. MARTELLI¹

¹Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione Diagnostica di Reggio Emilia;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione Diagnostica di Bologna;

⁴Dipartimento di Produzioni animali, Biotecnologie Veterinarie e
Sicurezza Alimentare Università di Parma

Parole chiave: malattia respiratoria acuta, citochine, proteine di fase acuta (APP), liquido bronco-alveolare (BALF), suino.

Key words: acute respiratory disease, cytokines, acute phase proteins (APP), broncho-alveolar lavage fluid (BALF), pig.

Riassunto

Scopo del presente lavoro è stato la valutazione dell'evoluzione delle manifestazioni cliniche, dei quadri radiografici polmonari *in vivo* e del pattern infiammatorio/immunitario citochinico nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero di suini sottoposti a trattamento antibatterico con amoxicillina per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Lo studio è stato compiuto su suini ibridi commerciali con malattia respiratoria spontanea acuta. Gli animali sono stati monitorati per 20 giorni dopo somministrazione intramuscolare di amoxicillina effettuata all'esordio della sintomatologia. La sintomatologia clinica respiratoria, la mortalità correlata, le lesioni polmonari e la presenza di agenti batterici e virali responsabili di co-infezione sono state determinate rispettivamente mediante score clinico, esame radiografico, indagini batteriologiche sul BALF e sierologia; la reattività infiammatoria/immunitaria è stata valutata come livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α)/immunitarie (IL-10) e proteine di fase acuta (CRP, aptoglobina, LBP) mediante ELISA e real-time PCR.

Si è evidenziato un decorso clinico della patologia respiratoria caratterizzato da una fase iniziale di acuzie associata a lesioni polmonari radiografiche a carattere di consolidamento prevalentemente a livello delle porzioni dorso-caudali ed una successiva evoluzione fino alla pressoché completa remissione dei sintomi. La mortalità è stata riconducibile a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, sierotipo 9. I markers infiammatori hanno mostrato un incremento iniziale e successiva riduzione in associazione all'evoluzione della malattia respiratoria, pur con variazioni individuali e con tipologia di andamento differente. Anche se caratterizzato da maggior variabilità, l'andamento della citochina immunoregolatrice negativa IL-10 si è modificato in relazione allo stato infiammatorio, a testimonianza di una regolazione concertata tra meccanismi di reattività cellulare in presenza di infezione.

Abstract

The aim of the present work was the evaluation of the evolution of the clinical signs, pulmonary lesions at radiography and inflammatory/immune cytokine patterns in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum of pigs treated with amoxicillin for the control of spontaneous acute respiratory disease sustained by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The study was performed using crossbred conventional pigs showing acute respiratory disease; the animals were monitored for 20 days after intramuscular administration of amoxicillin at the onset of clinical signs. Respiratory clinical signs, mortality associated with respiratory disease, pulmonary lesions and the presence of bacteria and viruses responsible of co-infections were determined respectively by clinical scores, radiography, bacteriology on BALF and serology; the inflammatory/immune reactivity was evaluated as levels of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α)/immune (IL-10) cytokines and acute phase proteins (CRP, haptoglobin, LBP) by ELISA and real-time PCR. Clinical, microbiological, radiological and biochemical-clinical analyses did not show different outcome among animals. All subjects showed a clinical outcome of acute respiratory disease characterized by pulmonary consolidation (especially dorsal-caudal) radiographic views. Mortality was due to pleuropneumonia associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 9. The pro-inflammatory markers showed an increase and subsequent decrease associated with the development of respiratory disease, despite individual levels and courses were different. The IL-10 course resulted more variable and changes in association with the inflammatory cytokine levels, testifying a concerted regulation of cellular reactivity following infection.

INTRODUZIONE

Nelle attuali condizioni dell'allevamento suinicolo, il controllo delle patologie respiratorie non può più avvalersi del solo contributo dell'intervento chemioterapico-vaccinale, soprattutto perché ben più ampio appare lo scenario che caratterizza l'approccio ad un'infezione e che globalmente coinvolge l'allevamento nella sua interezza. In argomento di prevenzione delle patologie ad impatto produttivo e di controllo delle infezioni che le caratterizzano, l'interesse viene oggi rivolto all'adozione di programmi sanitari combinati, applicati secondo criteri che necessariamente impongono il superamento della "fase empirica della medicina veterinaria applicata all'allevamento" per adottare una sempre più razionale strategia che nella sua complessità consideri svariati aspetti che vanno ben oltre la vaccinazione e l'impiego degli antibiotici e che coinvolgono le scelte gestionali ed ambientali.

L'applicazione strategica di questi programmi combinati nei confronti di un'infezione o di più infezioni (co-infezioni) deve considerare in primo luogo il conseguimento di

una diagnosi eziologica frutto di un percorso diagnostico collaterale di laboratorio che accerti il ruolo delle singole infezioni e, successivamente, fissi l'obiettivo che si vuole raggiungere in termini di controllo attraverso l'applicazione degli strumenti di profilassi e terapia più idonei e mirati a contrastare la situazione specifica della realtà produttiva in questione anche in relazione alle potenzialità manageriali e strutturali (Marois et al., 2009, Merialdi et al., 2011).

Nell'impostazione di questi protocolli combinati di intervento, sempre maggiore rilevanza viene assunta dalla conoscenza dell'epidemiologia delle infezioni che scaturisce da evidenze diagnostiche sperimentali proprie di ciascuna realtà produttiva. Non meno importante appare l'obiettivo di fornire un contributo alla conoscenza dell'evoluzione della malattia respiratoria acuta sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae* a seguito di trattamento antibatterico specifico, soprattutto in relazione all'evoluzione anatomica e funzionale (clinica) dei quadri patologici (Bosse et al., 2002; Lauritzen et al., 2003, Thacker et al. 2006).

Scopo del presente lavoro è stato verificare, per un periodo di osservazione di 20 giorni dalla comparsa dello stato febbrile e delle manifestazioni respiratorie (dispnea), l'evoluzione delle manifestazioni cliniche, delle lesioni polmonari in vita mediante esame radiografico, e del pattern infiammatorio citochinico nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero di suini sottoposti a trattamento antibatterico con amoxicillina per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da batteri sensibili.

MATERIALI E METODI

Animali

I suini allocati nello studio sono stati selezionati nell'ambito di gruppi in cui la presenza di polmonite batterica (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. e/o altri microrganismi) è stata confermata mediante l'evidenza di lesioni anatomopatologiche specifiche e dai rilievi microbiologici nell'allevamento di origine. Per poter essere incluso nello studio, ogni singolo animale ha soddisfatto i seguenti criteri di inclusione: a) febbre ($T > 40.0^{\circ}\text{C}$) e b) score clinico (somma di score dispnea + depressione del sensorio) ≥ 3 .

Nello studio sono stati inclusi 10 suini ibridi commerciali, 5 maschi e 5 femmine, di circa tre mesi, del peso medio di 15 kg. I suini, alla comparsa della malattia spontanea, sono stati ricoverati come degenti presso le idonee strutture dell'unità di isolamento dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma per tutta la durata del periodo di osservazione e alimentati con mangime per suini del commercio non medicato, con disponibilità *ad libitum* di acqua ed alimento. La cura degli animali e l'accesso alle strutture è avvenuto nel rispetto delle procedure operative standard della struttura ospitante.

Il giorno dell'inclusione i suini sono stati identificati mediante marche auricolari numerate e trattati con amoxicillina per via intramuscolare secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice per quanto attiene al dosaggio e durata del trattamento.

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad un esame clinico giornaliero dal giorno 0 al giorno 20, alla stessa ora ogni giorno. Il giorno 0, 5, 10 e 20 i suini sono stati pesati individualmente.

I parametri clinici osservati/annotati e il relativo punteggio sono riportati nella tabella 1.

Dispnea	<p>0 = assente (respirazione normale)</p> <p>1 = lieve/moderata (lieve aumento dello spostamento della gabbia toracica e lieve respirazione addominale, respirazione a bocca chiusa)</p> <p>2 = media (marcato aumento dello spostamento della gabbia toracica e della respirazione addominale, respirazione a bocca chiusa)</p> <p>4 = grave (marcato aumento dello spostamento della gabbia toracica e della respirazione addominale, respirazione a bocca aperta)</p>
Tosse (individuale)	<p>0 = assente</p> <p>1 = lieve/moderata (presente in seguito a sollecitazione*)</p> <p>2 = grave (anche spontanea)</p> <p>* = <i>stimolo ad alzarsi e/o camminare</i></p>
Scolo nasale	<p>0 = assente</p> <p>1 = presente</p>
Depressione del sensorio	<p>0 = assente</p> <p>1 = lieve/moderata</p> <p>2 = grave</p> <p>4 = morte</p>
Osservazioni concomitanti (si/no)	<p>I sintomi nervosi</p> <p>II diarrea</p> <p>III altro (specificato)</p>
Reazioni al punto di iniezione	<p>I arrossamento (eritema)</p> <p>II tumefazione</p> <p>III ascesso</p> <p>IV altro</p>

Tabella 1. Parametri clinici considerati e relativo punteggio in funzione della gravità.
Table 1. *Clinical signs and scores based on severity.*

Mortalità/necropsia

Tutti i casi di morte sono stati annotati. Su ogni suino morto è stato effettuato un esame anatomopatologico macroscopico, con particolare attenzione e descrizione delle lesioni polmonari.

Indagini radiografiche

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad indagine radiografica nelle due proiezioni ortogonali (LL: latero-laterale e DV: dorso-ventrale) al momento dell'inclusione (tempo 0) e dopo 5, 10 e 20 giorni dall'esordio della fenomenologia clinica al fine di valutare l'estensione e l'evoluzione delle lesioni *intra vitam*. Al fine di permettere il contenimento dell'animale e l'immobilità necessaria per l'esecuzione delle indagini radiografiche, i soggetti sono stati sottoposti a sedazione mediante impiego di azaperone e ketamina ai dosaggi consigliati.

Ciascuna indagine radiografica (due proiezioni ortogonali) per ogni animali ai diversi tempi, oltre ad essere stata descritta riguardo all'estensione e gravità dei quadri, è stata sottoposta a valutazione mediante attribuzione di un punteggio in grado di qualificare la gravità e l'estensione del danno anatomico.

La valutazione della gravità (sede di interessamento della polmonite, grado di estensione delle lesioni) al fine di permettere l'attribuzione di un punteggio è avvenuta applicando lo schema di scoring comunemente adottato per la valutazione delle lesioni macroscopiche polmonari in sede di macellazione secondo Madec (Figure 1).

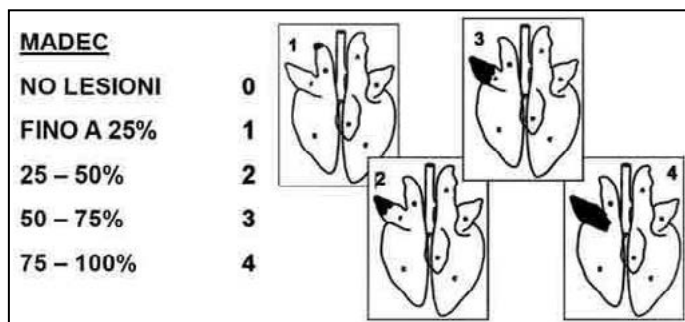


Figura 1: Griglia di Madec. Per ogni lobo viene assegnato un punteggio da 1 a 4, dipendente dalla estensione della lesione. Il punteggio massimo ottenibile è 28.

Figure 1: Madec grid. Each lobe affected by pneumonia is scored from 1 to 4, depending on the extension of the lesion. The highest score is 28.

Prelievi di campioni di sangue

Al momento dell'inclusione (0) e dopo 5, 10 e 20 giorni sono stati eseguiti prelievi di sangue venoso dalla vena giugulare; l'emosiero è stato separato mediante centrifugazione a 400 xg per 10 min. e congelato a -80°C fino all'analisi.

Prelievo di liquido bronco-alveolare

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo di liquido bronco-alveolare (BALF) al momento dell'inclusione (tempo 0) e dopo 5, 10 e 20 giorni in presenza dello stato di sedazione farmacologicamente indotto in occasione dell'esecuzione degli accertamenti radiografici. Il prelievo di BALF è stato effettuato utilizzando le usuali metodiche. Dal BALF ottenuto è stata predisposta un'aliquota per le analisi virologiche e batteriologiche. Il restante volume è stato centrifugato a 400 xg per 10 min., il surnatante è stato congelato a -80°C per la quantificazione di citochine pro-infiammatorie e proteine di fase acuta mediante ELISA mentre il pellet cellulare è stato risospeso in RPMI-1640 + 50% FBS + 10% DMSO e congelato in azoto liquido fino all'estrazione dell'RNA.

Esami su liquido bronco-alveolare

Il liquido bronco-alveolare è stato sottoposto ad accertamenti batteriologici e virologici mediante tecnica PCR per la ricerca di PRRSV, PCV2, SIV e ADV (Ganter et al., 1993, Kahlisch et al., 2009).

Sierologia

Per ciascun animale, su campioni di emosiero prelevati al momento dell'inclusione e a 5, 10 e 20 giorni, sono stati effettuati accertamenti sierologici volti a determinare la presenza di anticorpi nei confronti dei comuni virus respiratori (SIV, ADV, PRRS e PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie e delle proteine di fase acuta (APP) mediante ELISA

Nei campioni di BALF e di siero sono stati valutati mediante tecnica ELISA la presenza e i livelli delle seguenti citochine pro-infiammatorie (Huang et al., 1999) e proteine di fase acuta (acute phase proteins, APP; Heegaard et al., 1998, Hultén et al., 2003): TNF- α (Porcine TNF- α Cytoset -Invitrogen), IL-6 (Porcine IL-6 Quantikine ELISA - R&D Systems), IL-1 β (Porcine IL-1 β Quantikine ELISA - R&D Systems), Aptoglobina (HPT ELISA Kit - Usn Life Science Inc.), LBP (LBP ELISA Kit - Hycult Biotech), CRP (CRP ELISA kit, Usn Life Science Inc.).

Quantificazione dell'espressione genica di citochine mediante Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule del BALF utilizzando TRI-Reagent (Ambion) secondo le istruzioni del produttore. All'RNA ottenuto (1 μ g) portato ad un volume di 10 μ l con H₂O DEPC sono stati aggiunti 10 μ l di una miscela contenente dNTPs, random primers e trascrittasi inversa (High Capacity RNA-to-cDNA[®] kit - Applied Biosystems), e quindi sottoposti a retrotrascrizione secondo profilo termico indicato dal produttore. L'analisi dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α) è stata effettuata mediante real-time PCR utilizzando termociclatore StepOne[™] (Applied Biosystems, StepOne software v. 2.1). Il cDNA ottenuto (40 ng/20 μ l) è stato amplificato usando master mix Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e primer specifici (MWG) (Tabella 2).

Gene	Sequenze primer (forward - reverse)	Concentrazione (nM)
TNF- α (Meissonnier et al., 2008)	for 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'	300
	rev 5'-GGCGACGGCTTATCTGA-3'	300
IL-10 (Royae et al., 2004)	for 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	300
	rev 5'-TCTGGTCTTCGTTTGAAAGAAA-3'	300
IL-1 β (von der Hardt et al., 2002)	for 5'-ATGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	300
	rev 5'-TTGTTGCTATCAICTCCTTGCAC-3'	300
IL-8 (Royae et al., 2004)	for 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'	300
	rev 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'	300
IL-6 (Meissonnier et al., 2008)	for 5'-GGCAAAAGGGAAAGAATCCAG-3'	150
	rev 5'-GGATAAGCTGCAGTCACAGAACG-3'	150
MCP-1 (Che et al., 2011)	for 5'-CGGCTGATGAGCTACAGAAGAGT-3'	150
	rev 5'-GCTTGGGTCTGCACAGATCT-3'	150
GAPDH (Primer Express)	for 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	300
	rev 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'	300

Tabella 2: Citochine indagate mediante real-time PCR con corrispettive sequenze primer e concentrazioni.

Table 2: Cytokines evaluated by real-time PCR with corresponding primer sequences and concentrations.

Il gene GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento secondo Fisher et al. (2006) e Ferrari et al. (2010). Il profilo termico della PCR ha previsto uno step di denaturazione a 95°C per 20 sec. e 40 cicli di amplificazione con denaturazione a 95°C per 3 sec. ed annealing/estensione a 60°C per 30 sec. Un controllo negativo in assenza di cDNA stampo è stato incluso ad ogni corsa ed una curva di denaturazione (60-95°C) è stata inclusa per escludere amplificazioni aspecifiche dovute a dimeri di primer. I dati sono stati analizzati mediante metodo del delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) in cui i livelli di espressione di ciascuna citochina sono stati normalizzati con i livelli di GAPDH ed espressi come quantità relative.

Parametri di valutazione

Al fine di permettere una valutazione complessiva del decorso della malattia respiratoria sono stati considerati i seguenti parametri:

- Score clinico
- Mortalità (naturale, eutanasia) per malattia respiratoria
- Reazioni avverse al sito di iniezione
- Variazioni dell'evoluzione delle lesioni polmonari all'indagine radiografica
- Valutazione delle modificazioni delle singole citochine e delle proteine di fase acuta (Baarsch et al., 1995; Cho et al., 2002; Benga et al., 2009; Chen et al., 2011; Sjölund et al., 2011)
- Risultati delle indagini microbiologiche (Costa et al., 2011)

Analisi statistica

Le variabili demografiche, i fattori di rischio, i parametri vitali e i risultati delle indagini batteriologiche sono stati adeguatamente riassunti. Le variabili continue sono state riportate come medie, mediane e deviazione standard mentre le variabili discrete sono state riportate come frequenze e percentuali in opportune tabelle di contingenza. Per l'elaborazione statistica dei dati sono state utilizzate le procedure del Sistema di Analisi Statistiche (SAS)

Dopo aver valutato lo score clinico, i dati, espressi su scala ordinale e ripetuti nel tempo (ovvero i singoli punteggi di dispnea, tosse, depressione e scolo nasale), sono stati analizzati con modelli lineari per variabili categoriche e misure ripetute (procedura CATMOD del SAS) mentre le variabili continue sono state analizzate con modelli di ANOVA appropriati. Infine, per quanto riguarda la mortalità totale e per cause specifiche, i dati sono stati raggruppati in tabelle di frequenza ed analizzati con il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Mortalità

Come mostrato dalla tabella relativa alla mortalità (tabella 2), sono venuti a morte 4 soggetti.

ANIMALE	MORTALITÀ
1	SOPRAVVISSUTO
2	MORTO (giorno 11)
3	SOPRAVVISSUTO
4	MORTO (giorno 11)
5	SOPRAVVISSUTO
6	SOPRAVVISSUTO
7	MORTO (giorno 17)
8	SOPRAVVISSUTO
9	SOPRAVVISSUTO
10	MORTO (giorno 1)

Tabella 3: Mortalità durante il periodo di osservazione.

Table 3: Mortality during the observation period

Temperatura rettale e clinical score

Temperatura rettale e clinical score sono stati registrati ogni giorno durante le ore del mattino. Per quanto attiene ai risultati, si deve segnalare che in tutti i soggetti arruolati è stato osservato un clinical score ³ 3 e febbre persistente per la quasi completa durata della prova. I risultati non vengono mostrati a motivo dell'indifferenza che assumono nella valutazione critica dei risultati.

Indagini radiografiche

Al fine di valutare l'entità delle lesioni polmonari sono state eseguite indagini radiografiche nelle due proiezioni ortogonali LL e DV.

I risultati dello scoring delle lesioni parenchimali all'indagine radiografica sono di seguito riportate.

ANIMALE	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	0,0	1,0	16,0	0,0
2	0,0	5,0	5,0	*
3	0,0	4,0	14,0	2,0
4	0,0	13,0	14,0	*
5	0,0	6,0	9,0	4,0
6	0,0	1,0	8,0	3,0
7	0,0	1,0	13,0	*
8	0,0	1,0	2,0	1,0
9	0,0	5,0	3,0	3,0
10		*	*	*
TOTALE	0,0	4,0	9,3	2,2

Tabella 4: Risultato dei punteggi polmonari effettuati sui radiogrammi.

* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.

Table 4: Lung scoring at RX imaging.

* Missing data refer to dead pigs.

Si deve rilevare che al momento della comparsa della febbre e della dispnea l'immagine radiografica non permette di evidenziare alcuna lesione significativa e che l'entità maggiore del danno anatomico si rileva a circa 10 giorni dopo la comparsa della febbre. Dopo 20 giorni dalla comparsa della sintomatologia l'evoluzione favorevole della patologia negli animali sopravvissuti non ha ancora completato la fase di risoluzione, stante ancora la presenza di lesioni radiografiche di modica entità per gravità ed estensione ma pur sempre presenti.

Si riportano le immagini più significative in relazione ai punteggi ottenuti nei tempi considerati.

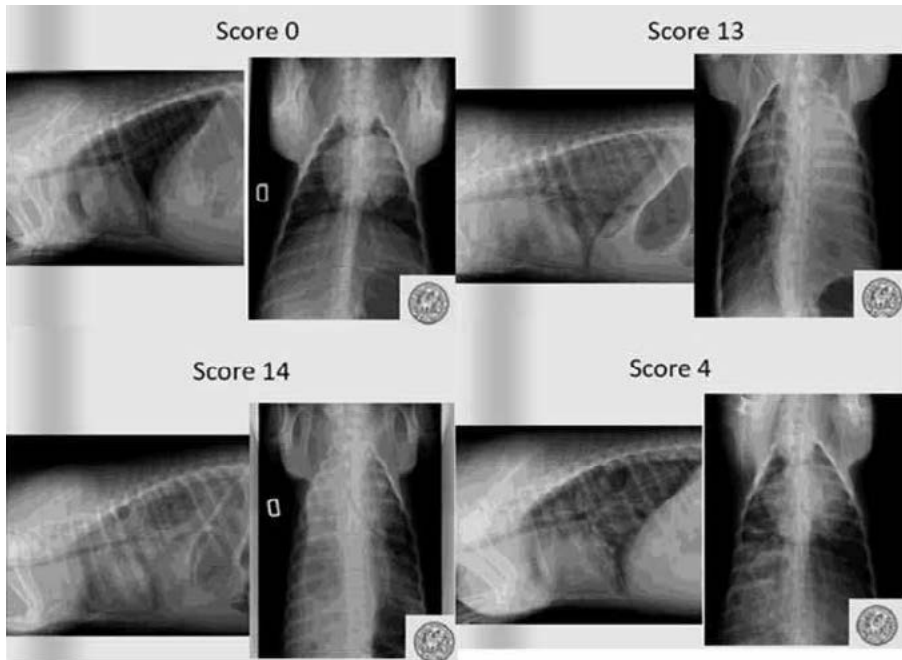


Figura 2: Proiezioni latero-laterale e ventro-dorsale del torace che evidenziano l'evoluzione delle modificazioni del pattern polmonare.

Figure 2: RX latero-lateral and ventro-dorsal views of the thorax showing the progression of the pulmonary pattern changes.

Pesi e incrementi ponderali

I pesi individuali e gli incrementi ponderali sono indicati analiticamente rispettivamente nelle tabelle 5 e 6.

ANIMALE	PESO			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	16,55	17,20	19,05	22,90
2	15,50	16,80	14,60	*
3	18,30	19,70	20,70	24,15
4	13,60	13,60	12,70	*
5	15,35	16,60	15,95	15,20
6	15,65	17,00	15,85	17,30
7	15,80	18,85	16,85	*
8	15,70	18,90	17,80	21,50
9	16,80	18,00	19,70	19,50
10	13,00	*	*	*
MEDIA	15,63	17,41	17,02	20,09

Tabella 5: Peso degli animali ai tre tempi considerati.

* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.

Table 5: Individual body weight at the considered times.

* Missing data refer to dead pigs.

ANIMALE	Da 0 a 5 GIORNI	Da 5 a 10 GIORNI	Da 10 a 20 GIORNI	Da 0 a 20 GIORNI
1	0,13	0,37	0,39	0,32
2	0,26	-0,44	*	*
3	0,28	0,20	0,35	0,29
4	0,00	-0,18	*	*
5	0,25	-0,13	-0,08	-0,01
6	0,27	-0,23	0,15	0,08
7	0,61	-0,40	*	*
8	0,64	-0,22	0,37	0,29
9	0,24	0,34	-0,02	0,14
10		*	*	*
MEDIA	0,30	-0,08	0,19	0,19

Tabella 6: Incrementi ponderali giornalieri (kg) negli intervalli temporali considerati.

* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.

Table 6: Average daily weight gains (kg) in the considered periods.

* Missing data refer to dead pigs.

Esami microbiologici e sierologici

I risultati degli accertamenti microbiologici eseguiti sul liquido bronco-alveolare e degli accertamenti sierologici ottenuti ai tempi considerati sono riportati in tabella 7.

ANIMALE	INDAGINI MICROBIOLOGICHE PER APP			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
5	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
6	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
8	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
10	NEGATIVO	*	*	*

Tabella 7: Risultati delle analisi batteriologiche sul BALF.

(s.9): positività verso APP sierotipo 9.

* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.

Table 7: Microbiological findings from BALF.

(s.9): positivity to APP serotype 9.

* Missing data from dead pigs.

NUMERO	INDAGINI SIEROLOGICHE PER APP			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
10	NEGATIVO	NEGATIVO	*	*

Tabella 8: Risultati delle indagini sierologiche su emosiero. (§) positività sierologica verso APP sierotipi 1, 9, 11.

* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.

Table 8: Results of the serological investigation. (§) seropositivity to APP serotypes 1, 9 and 11.

* Missing data refer to dead pigs.

Indagini anatomopatologiche

Sugli animali deceduti sono state effettuate indagini necroscopiche anatomopatologiche che hanno costantemente evidenziato quadri di pleuropolmonite a carattere necrotico-emorragico con evoluzione purulenta e siero-fibrinosa di gravità variabile costantemente ritenute causa dell'*exitus* dell'animale.

Livelli di citochine e proteine di fase acuta nel BALF e siero (ELISA)

I risultati delle determinazioni delle singole citochine e delle proteine di fase acuta (APP) sono indicati nelle tabelle 9, 10, 11 e 12. Nelle tabelle sono riportati anche i valori degli score polmonari radiografici al fine di permettere una migliore interpretazione dei dati. Per quanto attiene alla valutazione degli andamenti temporali di IL-1 β (siero), IL-6, e TNF- α , l'analisi in ELISA non ha dato risultati attendibili per problemi di rilevabilità nelle matrici utilizzate.

Per quanto attiene alle proteine di fase acuta analizzate (CRP: C Reactive Protein, HP: aptoglobina, LBP: Lipopolisaccaride Binding Protein) e alla citochina pro-infiammatoria IL1- β , gli andamenti rilevati ai singoli soggetti confermano il ruolo di markers di monitoraggio dell'infiammazione (Fossum et al., 1998, Fossum et al., 2006) in quanto hanno manifestato un incremento e decremento nel tempo, ma non consentono di evidenziare differenze statisticamente significative tra i tempi considerati.

I risultati relativi a questi parametri indicatori dell'evoluzione infiammatoria confermano quanto evidenziato attraverso lo studio dei parametri clinici e radiografici sull'evoluzione della malattia respiratoria acuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Proteina C Reattiva (CRP)

ANIMALI	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
	RX	CRPBALF ng/ml	CRPSIERO ng/ml	RX	CRPBALF ng/ml	CRPSIERO ng/ml	RX	CRPBALF ng/ml	CRPSIERO ng/ml	RX	CRPBALF ng/ml	CRPSIERO ng/ml
1	0	0,48	0,78	1	3,02	3,36	16	9,84	2,45	0	0,24	1,59
2	0	0,65	1,02	5		4,31	5	2,83	5,74	morto		
3	0	0,52	0,69	4	6,04	4,80	14		2,73	2	0,65	1,05
4	0	0,48	0,57	12	3,59	4,67	14	3,54	2,49	morto		
5	0	0,70	1,86	6	5,63	5,42	9	4,52	2,94	4	0,64	2,99
6	0	0,41	0,13	1	1,22	3,80	8	0,87	3,98	3	0,31	1,40
7	0	0,48	0,46	1	2,48	3,24	13	6,99	2,59	morto		
8	0	0,37	1,52	1	1,00	4,10	2	0,32	2,59	1	0,74	1,72
9	0	0,24	1,61	5	0,21	1,54	3	3,09	6,21	3	0,37	0,61
10		0,45	1,96	morto			morto			morto		
Totale	0	0,48	1,06	4,0	2,90	3,92	9,3	4,00	3,52	2,2	0,50	1,56

Tabella 9: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di Proteina C Reattiva (CRP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.

Table 9: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of C reactive protein (CRP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.

Aptoglobina (HP)

ANIMALI	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
	RX	HPBALF µg/ml	HPSIERO µg/ml	RX	HPBALF µg/ml	HPSIERO µg/ml	RX	HPBALF µg/ml	HPSIERO µg/ml	RX	HPBALF µg/ml	HPSIERO µg/ml
1	0	4,57	2873,79	1	2,21	2155,94	16	5,35	5350,31	0	4,95	2676,99
2	0	6,12	2763,33	5	2,81	2781,69	5	4,79	4794,14	morto		
3	0	6,01	2840,46	4	3,65	2984,05	14	4,91	4912,33	2		2651,00
4	0	4,12	2089,12	12	4,27	2517,79	14	5,54	5538,84	morto		
5	0	4,87	2632,89	6	1,74	2569,14	9	4,37	4366,71	4	3,76	2651,18
6	0	6,34	2511,44	1	3,84	2765,93	8	2,54	2539,01	3	6,63	3145,01
7	0	1,43	2670,99	1	5,34	2731,15	13	5,42	5419,17	morto		
8	0	3,38	2311,58	1	3,43	2504,99	2	5,23	5231,12	1	3,55	3215,16
9	0	4,53	2679,89	5	4,42	3027,50	3	5,35	5350,31	3	5,77	2795,30
10		0,99	2698,47	morto			morto			morto		
Totale	0	4,24	2607,20	4,0	3,52	2670,90	9,3	4,83	4833,50	2,2	4,93	2855,80

Tabella 10: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di aptoglobina (HP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.

Table 10: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of haptoglobin (HP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.

Lipopolisaccaride Binding Protein (LBP)

ANIMALI	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml
1	0	7,83	16500	1	26,86	29000	16	16,53	15000	0	16,30	4500
2	0	2,13	29500	3	6,88	23500	5	16,63	10250	morte		
3	0	6,35	17500	4	37,08	28150	14		11250	2	3,25	4950
4	0	4,79	4700	12	22,93	23000	14	13,95	12600	morte		
5	0	3,37	13000	6	19,69	25000	9		10050	4	3,07	5000
6	0	9,40	8500	1	25,24	16000	8	10,95	10300	3	7,05	4050
7	0	5,84	14650	1	20,55	22000	13	18,73	12020	morte		
8	0	1,35	7000	1	24,89	5000	2	13,38	13650	1	6,70	4990
9	0	5,12	7500	5	32,68	8000	3	13,09	14200	3	5,34	3000
10		0,98	8000	morte			morte			morte		
Totale	0	4,70	12685,0	4,0	26,30	19961,1	9,3	14,80	12146,7	2,2	7,00	4415,0

Tabella 11: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di lipopolisaccaride binding protein (LBP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.

Table 11: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of lipopolisaccaride binding protein (LBP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.

Interleuchina-1 β (IL-1 β)

ANIMALI	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
	RX	IL-1 β BALF pg/ml	IL-1 β SIERO pg/ml	RX	IL-1 β BALF pg/ml	IL-1 β SIERO pg/ml	RX	IL-1 β BALF pg/ml	IL-1 β SIERO pg/ml	RX	IL-1 β BALF pg/ml	IL-1 β SIERO pg/ml
1	0	0	-	1	29,20	-	16	0	-	0	108,37	-
2	0	1,67	-	5			5	1878,21	-	morte		
3	0	0	-	4	106,48	-	14			2	0	-
4	0	79,74	-	12	234,09	-	14	79,50	-	morte		
5	0	149,03	-	6			9	1813,63	-	4	1289,37	-
6	0	0	-	1	531,95	-	8	314,10	-	3	0	-
7	0	0	-	1			13	7,23	-	morte		
8	0	0	-	1	1,66	-	2	169,78	-	1	578,97	-
9	0	0	-	5			3	0	-	3	182,47	-
10	0	0	-	morte			morte			morte		
Totale	0	23,00	-	4	180,70	-	9,3	532,8	-	2,2	359,90	-

Tabella 12: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di interleuchina-1 β (IL-1 β) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero. – Livello non determinato.

Table 12: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of interleukin-1 β (IL-1 β) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum. – Level not determined.

Livelli di espressione di citochine nelle cellule del BALF (real-time PCR)

L'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, IL-6, MCP-1, TNF- α) ha evidenziato come lo stato infiammatorio sia aumentato a partire da 5 giorni ed abbia avuto intensità massima a 10 giorni, per poi diminuire a 20 giorni (tabella 13). Nello specifico, in alcuni animali, soprattutto i livelli di IL-1 β , IL-8 e TNF- α hanno mostrato un incremento tra 10 e 20 giorni. Il permanere di livelli elevati di citochine pro-infiammatorie a 20 giorni testimonia come l'evoluzione e la eventuale risoluzione dell'infezione si sia dimostrata variabile in relazione alla diversa reattività del singolo animale ed indipendentemente dall'effetto della terapia antibiotica, che comunque appare insufficiente al miglioramento del quadro clinico e biochimico oltre che radiografico.

Le modificazioni dell'espressione della citochina immunomodulatrice negativa IL-10 sono apparse più variabili; comunque è stata osservata una riduzione di espressione in vari animali a 10 giorni, in parallelo all'aumento delle citochine pro-infiammatorie, in particolare di IL-1 β , IL-8 e MCP-1.

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-1 β	1		1.37	9.43	5.33
	2	1.00	0.23	23.32	morto
	3	3.22	4.21		
	4	6.00	4.60	4.96	morto
	5	4.98		89.26	80.76
	6	1.98	2.71	192.37	
	7	1.61	3.57	2.77	morto
	8	1.81	1.16	8.97	77.41
	9	1.38	1.93		53.11
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-8	1		0.82	15.05	9.62
	2	1.00	1.95	62.05	morto
	3	1.55	6.49		
	4	3.58	1.77	27.27	morto
	5	15.91		95.10	187.85
	6	3.93	5.24	377.81	
	7	0.45	4.08	3.09	morto
	8	7.93	21.37	20.97	231.02
	9	4.37	0.64		112.74
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-6	1		0.11	2.38	0.03
	2	1.00	0.51	3.64	morto
	3	0.21	10.33		
	4	0.42	0.29	1.35	morto
	5	0.85		10.26	1.65
	6	0.35	2.44	9.41	
	7	0.29	1.31	1.28	morto
	8	0.06	0.83	4.17	8.81
	9	4.90	0.32		1.62
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
MCP-1	1		0.60	4.15	0.14
	2	1.00	2.06	11.02	morto
	3	0.33	4.16		
	4	0.07	4.44	0.06	morto
	5	6.83		12.29	4.76
	6	5.06	10.21	3.61	
	7	0.03	2.82	0.15	morto
	8	0.98	4.37	7.23	9.66
	9	0.33	0.15		8.70
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
TNF- α	1		0.58	4.01	0.65
	2	1.00	0.32	1.89	morto
	3	1.47	0.39		
	4	1.57	0.83	5.07	morto
	5	1.93		6.27	10.81
	6	1.37	0.64	9.59	
	7	0.55	1.80	4.31	morto
	8	1.93	0.56	2.99	10.20
	9	1.28	0.62		6.64
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-10	1		0.40	0.28	0.23
	2	1.00	4.47	2.62	morto
	3	1.76	2.60		
	4	1.49	0.85	1.04	morto
	5	0.18		8.60	2.22
	6	0.45	1.92	6.28	
	7	0.84	1.24	0.47	morto
	8	0.12	1.76	1.30	4.46
	9	0.16	0.40		3.37
	10		morto	morto	morto

Tabella 13: Livelli di espressione genica delle citochine pro-infiammatorie nel liquido bronco-alveolare (BALF).

Table 13: Levels of pro-inflammatory and immune cytokine gene expression in broncho-alveolar lavage fluid (BALF).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati delle indagini cliniche, microbiologiche, radiologiche e biochimico-cliniche relative ai markers infiammatori sia nel sangue che nel liquido bronco-alveolare (BALF)

hanno evidenziato un andamento pressoché sovrapponibile in tutti i soggetti considerati. In particolare, si è rilevato che il decorso clinico della malattia respiratoria osservata nella totalità dei soggetti considerati ha visto una fase iniziale di acuzie associata a lesioni polmonari radiologicamente riferibili a quadri di polmonite anche ad interessamento pressoché completo di un intero polmone, con una successiva evoluzione che se da un lato è stata caratterizzata dalla pressoché completa remissione dei sintomi, dall'altra ha visto la persistenza delle lesioni ancora al 20° giorno di osservazione. Si deve infatti sottolineare che, al termine del periodo di osservazione (20 giorni), alcuni soggetti denunciavano ancora la presenza di lesioni radiografiche che, seppur di modica entità (score <5), deponevano per una non completa *restituito ad integrum* della porzione parenchimale interessata dal processo infiammatorio. Per quanto attiene all'evoluzione dei pesi e degli incrementi ponderali giornalieri degli animali affetti dalla malattia respiratoria, si conferma la significativa influenza negativa dello stato patologico sui parametri della crescita tanto che dal 5° al 10° giorno di osservazione gli animali hanno denunciato un decremento ponderale giornaliero medio di 80 grammi. Su tutto il periodo di osservazione gli animali hanno avuto, mediamente, un incremento ponderale giornaliero di soli 190 grammi.

Ciò merita di essere considerato nell'ambito della valutazione della durata di un trattamento antibatterico. In effetti, i dati che emergono da questo studio supportano e corroborano quanto già ipotizzato a riguardo della durata del trattamento antibatterico in corso di polmonite o pleuropolmonite del maiale, segnatamente che la terapia antibatterica dovrebbe essere prevista di durata non inferiore a 14 giorni, analogamente a quanto già ampiamente applicato nella pratica clinica di altre specie animali soprattutto d'affezione (cane e gatto) oltre che nell'uomo. Dai dati ottenuti, infatti, si evince che il trattamento antibatterico, anche precocemente applicato come in questo caso, ossia alla comparsa dei prodromi della malattia, se non prolungato ben oltre cinque giorni di copertura antibatterica correntemente applicata nella pratica di allevamento, non è in grado di favorire la guarigione anatomo-funzionale e il re-isolamento del microorganismo così che i quadri radiografici depongono, in alcuni casi, per un'evoluzione cronica caratterizzata dalla persistenza delle lesioni anche a 20 giorni dall'esordio della malattia.

La mortalità elevata, riconducibile a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, come confermato dagli accertamenti batteriologici eseguiti sul BALF, dalla sierconversione verso APP e dalle lesioni anatomopatologiche macroscopiche suggestive di pleuropolmonite emorragico-fibrinosa nei soggetti deceduti, sottolinea che l'infezione da parte di un sierotipo a medio-alta patogenicità, quale è stata l'infezione dimostrata nel presente studio, può provocare la morte degli animali anche se opportunamente sottoposti a trattamento antibatterico precoce e mirato per sensibilità qualora non sia sufficientemente prolungato. La durata della terapia antibatterica e la relativa attività antibiotica nella biofase interessata dal processo infettivo-infiammatorio devono prevedere un effetto protratto nel tempo, poiché la sterilizzazione/guarigione microbiologica non avvengono in fase precoce quanto piuttosto in tempi successivi. Infatti, la maggior proporzione di soggetti il cui BALF è risultato positivo all'esame batteriologico si è rilevata al 20° giorno di osservazione, fatto che avvalorava ulteriormente l'evidenza che il trattamento precoce, seppur indispensabile, qualora non protratto nel tempo non è in grado di operare una "sterilizzazione" microbiologica, requisito essenziale per la guarigione e per l'arresto dell'evoluzione cronica spontanea della patologia pleuro-polmonare.

I markers infiammatori, valutati mediante ELISA nel BALF e nel siero (CRP, HP, LBP, IL-1 β) così come mediante real-time PCR nelle cellule del BALF (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α), hanno mostrato andamenti di incremento e successivo decremento nel tempo in

associazione all'evoluzione della malattia respiratoria, pur con variazioni individuali e con tipologia di andamento differente a seconda delle caratteristiche dei diversi marcatori. Anche se caratterizzato da maggior variabilità, l'andamento della citochina immunoregolatrice negativa IL-10 si è modificato in relazione allo stato infiammatorio, a testimonianza di una regolazione concertata tra meccanismi di reattività cellulare in presenza di infezione che supporta quanto sopra rilevato e discusso in ordine alle modificazioni anatomo-funzionali.

Le indagini preliminari condotte in questo studio permettono di concludere che l'evoluzione della malattia respiratoria acuta sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae* occupa uno spazio temporale dell'ordine di grandezza delle settimane (non inferiore a 15-21 giorni) e che il trattamento antibatterico, anche qualora applicato precocemente, ovvero all'esordio delle manifestazioni cliniche, se di durata limitata alla prima settimana, non è sufficiente a favorire la guarigione microbiologica e anatomo-funzionale della sede pleuro-polmonare, dando luogo ad una evoluzione protratta nel tempo in cui le lesioni anatomiche, seppur di entità ridotta rispetto alla fase di acuzie, permangono a sostegno di una evoluzione subacuta-cronica e dello scadimento delle condizioni generali dell'animale, soprattutto per quanto attiene agli incrementi ponderali giornalieri. Il fatto che il microrganismo implicato venga isolato con frequenza crescente col passare dei giorni dal momento dell'infezione naturale impone che la terapia antibiotica della polmonite acuta, soprattutto quando manifesta in associazione a quadri di pleuro-polmonite, venga protratta per almeno due settimane, onde permettere la guarigione microbiologica, premessa per una evoluzione favorevole anche in termini anatomici e funzionali.

RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata condotta grazie al finanziamento di Pfizer Animal Health-Italia a favore del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli Studi di Parma.

BIBLIOGRAFIA

Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K., Murtaugh M.P., 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 63, 3587-3594.

Benga L., Hoeltig D., Rehm T., Rothkoetter H.J., Pabst R., Valentin-Weigand P., 2009. Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms". *BMC Veterinary Research* 5, 13.

Bosse T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4, 225-235.

Che T.M., Johnson R.W., Kelley K.W., Van Alstine W.G., Dawson K.A., Moran C.A., Pettigrew J.E., 2011. Mannan oligosaccharide modulates gene expression profile in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Animal Science* 89, 3016-3029.

Chen Z.W., Chien M.S., Chang N.Y., Chen T.H., Wu C.M., Huang C., Lee C., 2011. Mechanisms underlying *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI induced expression of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Research* 42, 25.

Cho W.S. e Chae C., 2002. Expression of nitric oxide synthase-2 and tumor necrosis factor- α in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Pathology* 39, 27-32.

Costa G., Oliveira S., Torrison J., Dee S., 2011. Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 148, 246-251.

Ferrari L., Borghetti P., Gozio S., De Angelis E., Ballotta L., Smeets J., Blanchaert A., Martelli P., 2011. Evaluation of the immune response induced by intradermal vaccination by using a needle-less system in comparison with the intramuscular route in conventional pigs. *Research in Veterinary Science* 90, 64-71.

Fisher, T., Buttner, M., Rziha, H.J., 2006. T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (*Suid herpesvirus 1*)-primed swine indicates efficient immunization. *Immunology* 101, 378-387.

Fossum C., 1998. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig". *Domestic Animal Endocrinology* 15, 439-444.

Fossum C., Wattrang E., Fuxler L., Jensen K.T., Wallgren P., 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine - a possible role for serum interleukin-6. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64, 161-172.

Ganter M., Kipper S., Schottger-Wegener H., Beckmann G., Bunka S., 1993. Diagnosis of pneumonitis in living pigs by bronchoalveolar lavage. *Berliner & Munchner Tierurztliche Wochenschrift* 1116, 330-333.

Heegaard P., Klausen J., Nielsen P., Gonzalez-Ramon N., Pineiro M., Lampreave F., Alava M., 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119, 365-373.

Huang H., Potter A.A., Campos M., Leighton F.A., Willson P.J., Haines D.M., Yates W.D., 1999. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*: roles of proinflammatory cytokines. *Canadian Journal of Veterinary Research* 63, 69-78.

Hultén C., Johansson E., Fossum C., Wallgren P., 2003. Interleukin-6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 95, 75-89.

Kahlisch D., Buettner F.F., Naim H.Y., Gerlach G.F., 2009. Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary Research* 40, 60.

Lauritzen B., Lykkesfeldt J., Skaanild M.T., Angen Ø., Nielsen J.P., Friis C., 2003. Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment: an experimental model of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Research in Veterinary Science* 74, 261-270.

Marois C., Gottschalk M., Morvan H., Fablet C., Madec F., Kobisch M., 2009. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 135, 283-291.

Meriardi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P., 2011. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Veterinary Journal*. Dicembre 17.

Meissonnier G.M., Pinton P., Laffitte J., Cossalter A.M., Gong Y.Y., Wild C.P., Bertin G., Galtier P., Oswald I.P., 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231, 142-149.

Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K., 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 199-216.

Sjölund M., Fossum C., Martín de la Fuente A.J., Alava M., Juul-Madsen H.R., Lampreave F., Wallgren P., 2011. Effects of different antimicrobial treatments on serum acute phase responses and leucocyte counts in pigs after a primary and a secondary challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Record* 169, 70.

Thacker E., 2006. Lung inflammatory responses. *Veterinary Research* 37, 469-486.