

**VALUTAZIONE DEI FATTORI PREDISPONENTI E STUDIO
MORFOLOGICO E ISTOPATOLOGICO DELLE LESIONI
POLMONARI IN SOGGETTI INFETTI DA *MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE* VACCINATI E NON VACCINATI**

***EVALUATION OF PREDISPOSING FACTORS AND A
MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY
OF PULMONARY CHANGES IN VACCINATED AND
UNVACCINATED NATURALLY *MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE*-INFECTED PIGS***

PARISI F., GIULIOTTI L., BENVENUTI M. N., ROCCHIGIANI G., SALVADORI C.,
POLI A.

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Italy

Parole Chiave: fattori predisponenti, *Mycoplasma hyopneumoniae*, risposta immunitaria polmonare

Key words: local immune response, *Mycoplasma hyopneumoniae*, risk factors.

Riassunto: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*) e numerosi fattori predisponenti sono coinvolti nella patogenesi della polmonite enzootica (PEN). Lo scopo di questo studio è stato quello di studiare la correlazione tra i fattori relativi al management delle aziende e le lesioni polmonari associate alla PEN in suini macellati. Sono stati esaminati macroscopicamente millecentotré polmoni di suino di 18 lotti diversi provenienti da allevamenti italiani. Sono stati raccolti i dati relativi al sistema di produzione, alle pratiche di gestione e ai protocolli di vaccinazione. Centodieci campioni di tessuto polmonare sono poi stati fissati in formalina e sali di zinco per gli studi istopatologici e immunoistochimici, al fine di rilevare gli antigeni *Mh*, i linfociti B e T e i macrofagi. Il nostro studio ha rivelato che il ciclo aperto, un peso di messa a terra inferiore a 30 kg, la presenza di pavimenti fessurati e di ventilazione mista nello stesso allevamento sono importanti fattori predisponenti. Studi macroscopici e istopatologici hanno dimostrato come i soggetti vaccinati presentino lesioni polmonari meno gravi. Nei suini vaccinati senza lesioni polmonari è stato rilevato un aumento dei linfociti B nel BALT e nei setti inter-alveolari. I suini vaccinati con alterazioni polmonari hanno invece presentato una diminuzione dei linfociti B nel BALT, nella parete bronchiolare e nei setti inter-alveolari, un aumento del numero di linfociti T nei setti inter-alveolari e dei macrofagi nel BALT, nella parete bronchiolare e nei setti inter-alveolari. Il nostro studio ha evidenziato i principali fattori di rischio coinvolti nella patogenesi della PEN. Una risposta immunitaria tissutale di tipo umorale è risultata evidente in suini vaccinati senza lesioni polmonari, mentre gli animali vaccinati con polmonite hanno mostrato una riduzione dei linfociti B e una maggiore risposta di tipo cellulo mediata.

Abstract: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*) and several predisposing factors are involved in the pathogenesis of enzootic pneumonia (PEN). The aim of this study was to investigate the correlation between farm management factors and PEN associated pulmonary lesions in slaughtered pigs. One thousand one hundred and three lungs of fattened pigs from 18 different vaccinated and unvaccinated batches from Italian swine farms were macroscopically examined. Data related to production system, management practices

and vaccination protocols were collected. One hundred and ten lung tissue samples were formalin and zinc salts fixed for histopathological and immunohistochemistry studies to detect *Mh*, B- and T-lymphocytes, and macrophages antigens. Our study revealed that open cycle, growing-finishing weight lower than 30 kg, presence of slatted systems and mixed natural and forced ventilation systems are important predisposing factors. Macroscopic and histopathologic studies demonstrated that vaccinated subjects have less severe lung lesions. In vaccinated pigs without pulmonary lesions and increase in B-lymphocytes was detected in BALT and inter-alveolar septa. Vaccinated pigs with PEN lung alterations had a decrease of B-lymphocytes in BALT, bronchiolar wall and inter-alveolar septa and an increased number of T-lymphocytes in inter-alveolar septa and macrophages in BALT, bronchiolar wall and inter-alveolar septa. Our study evidenced the main risk factors involved in the pathogenesis of PEN. A positive humoral tissue immune response was evident in vaccinated pigs without lung lesions. while vaccinated animals with pneumonia showed a reduction of B-lymphocytes and an increased Th1 response.

INTRODUZIONE

La polmonite enzootica (PEN) è una malattia multifattoriale economicamente rilevante nell'allevamento suino dovuta a *Mycoplasma hyopneumoniae*, caratterizzata da bassa mortalità e morbilità molto elevata. La malattia è diffusa in tutto il mondo e la prevalenza stimata in Italia è del 59,9% (Ostanello et al., 2006). Si sospetta che diversi fattori predisponenti, tra cui ciclo di produzione, densità dei capi, condizioni climatiche e strutturali, prevenzione di altre malattie respiratorie e altri fattori che influenzano l'immunità della mandria (Stark, 2000; Maes et al., 2008) siano alla base dell'insorgenza della PEN tuttavia, al giorno d'oggi, il loro potenziale di influenzare questa patologia non è stato ancora pienamente chiarito. Diversi prodotti batterici in corso di infezione da *Mh* sono stati descritti come responsabili dell'alterazione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata che partecipa alla genesi delle lesioni descritte durante questa infezione, ma finora non sono stati condotti studi approfonditi su soggetti naturalmente infetti da *Mh*. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la correlazione tra fattori predisponenti, l'insorgenza e la gravità delle lesioni polmonari e le variazioni della risposta immunitaria a livello polmonare nei suini vaccinati e non vaccinati naturalmente infetti da *Mh*.

MATERIALI E METODI

Scelta dei campioni

Utilizzando il metodo descritto da Madec e Kobish (1982) sono stati esaminati 1103 polmoni provenienti da suini pesanti macellati tra gennaio 2016 a gennaio 2017. I soggetti provenivano da 18 allevamenti di suini del Centro e Nord Italia. Ogni lotto esaminato contava 135-136 maiali e tra questi sono stati esaminati macroscopicamente una media di 70 polmoni scelti a caso. Dal 10% dei polmoni esaminati sono stati prelevati dei campioni e trattati per studi istopatologici e immunoistochimici. I criteri di selezione si sono basati sull'assenza di alterazioni macroscopiche correlate ad altre infezioni batteriche.

Analisi macroscopica

Inizialmente i polmoni dei suini macellati sono stati valutati macroscopicamente per indagare la presenza di lesioni correlabili all'infezione di *Mh*. È stato assegnato uno *score* lobare da 0 a 4 a ciascun lobo polmonare seguendo lo schema proposto da Madec

e Kobish, (1982):

Punteggio 0: assenza di lesioni visibili;

Punteggio 1: lesione superficiale inferiore al 25% del lobo;

Punteggio 2: alterazione diffusa fino al 50% del lobo;

Punteggio 3: alterazione estesa fino al 75% del lobo;

Punteggio 4: oltre il 75% del lobo colpito da polmonite.

Tale punteggio è stato registrato per ciascuno dei lobi polmonari dei polmoni esaminati, ad eccezione di quello azigos e, successivamente, i vari punteggi sono stati sommati per raggiungere un punteggio polmonare totale compreso tra 0 e 24. Seguendo un procedimento simile a quello mostrato nello studio di Ostanello et al. (2006), è stato selezionato un punteggio polmonare totale pari a 4 quale *cut off* per discriminare i polmoni sani o con lievi segni di polmonite da quelli colpiti da PEN. La valutazione del punteggio delle lesioni polmonari è stata eseguita da un singolo investigatore (FP).

Attraverso un questionario sono stati raccolti i dati provenienti da tutti i lotti campionati inerenti la gestione dell'azienda e la vaccinazioni. Più in dettaglio, nei vari allevamenti sono stati indagati: tipologia di ciclo, numero di soggetti, densità di allevamento, tipo di razza / ibrido, acquisto di riproduttori, peso vivo finale, peso di messa a terra, età di messa a terra, peso all'ingrasso, età di ingrasso, tutto pieno/ tutto vuoto, ventilazione, pavimentazione, segni clinici di PEN, utilizzo di mangime medicato dopo lo svezzamento, farmaci strategici allo svezzamento e vaccinazione contro il virus della malattia di Aujeszky, influenza, leptospirosi, *Parvovirus*, *Erisipelotrix rhusiopathiae*, *Mh*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e rinite atrofica.

Istopatologia

I campioni di tessuto polmonare prelevati al macello sono stati fissati in formalina tamponata e sali di zinco, processati con metodi istologici di routine, inclusi in paraffina e tagliati a 4 µm di spessore.

Per l'analisi istologica le sezioni dei campioni fissati in formalina sono state colorate con ematossilina ed eosina (E-E). Le alterazioni istopatologiche tipiche della PEN (perdita di ciglia con essudato bronchiolare ed alveolare, iperplasia del BALT e cellularità infiammatoria interstiziale) sono state quantificate in otto campi / sezione ad alto ingrandimento microscopico, seguendo i criteri quantitativi di Hillen et al. (2014):

Punteggio 0 - assenza di alterazione istologica;

Punteggio 1 – lievi modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie;

Punteggio 2 – moderate modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie;

Punteggio 3 – gravi modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie.

I punteggi microscopici totali sono stati quindi raggruppati in punteggi bassi (0-1) e alti (2-3) e correlati alla presenza di vaccinazione contro *Mh*.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica per la localizzazione dell'antigene *Mh* e delle popolazioni di cellule immunitarie è stata eseguita su sezioni di tessuto fissate in sali di zinco e successivamente incluse in paraffina. Sezioni dello spessore di 4 µm sono state sparaffinate in xilene, idratati attraverso una serie graduata di etanolo e reidratati in acqua bidistillata. Il recupero dell'antigene è stato eseguito a caldo con tampone citrato pH 6.0 per gli anticorpi primari contro l'antigene *Mh*, CD3 e Iba-1 e con tampone tris EDTA pH 8 per l'anticorpo primario. Le sezioni sono state quindi raffreddate a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopo il lavaggio in soluzione salina tamponata Tween Tris allo 0,05% (TBST) a pH 7,6, l'attività della perossidasi endogena è stata

bloccata incubando le sezioni con la Peroxidase block solution®, (Dako, Glostrup, Denmark) per dieci minuti a temperatura ambiente e dopo sono stati eseguiti due lavaggi in TBST. Le reazioni aspecifiche sono state bloccate incubando ciascuna sezione con due gocce di Ultra V-block®, (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) per 5 minuti e successivamente gli anticorpi primari sono stati incubati in camere umide per un'ora a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: un anticorpo policlonale di topo anti-antigeni *Mh* (p46, MHJ_0511, MyBiosource, san Diego, CA, USA), un anticorpo monoclonale anti-CD3 umano (1: 100, clone F7.2.38, Dako, UK Ltd., Ely, Regno Unito), un anticorpo monoclonale anti-CD79a (1:50, clone HM57, Dak) e un anticorpo policlonale di coniglio anti Iba-1 (1: 300, Wako, Neuss, Germania). Dopo due lavaggi con TBST, questa fase è stata seguita da incubazione con IgG polivalente di capra biotinilato (Thermo Scientific) per 10 minuti. Dopo il lavaggio con TBST, il complesso streptavidina-perossidasi (Thermo Scientific) è stato messo a incubare per 30 minuti. L'attività della perossidasi è stata rivelata mediante incubazione per 10 minuti con 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate KIT®, Vector Labs inc., Burlingame, CA) e bloccata con acqua bidistillata. Infine, le sezioni sono state colorate con l'ematossilina di Mayer, disidratate e coperte con vetrini coprioggetto.

Analisi morfometrica e statistica

Le cellule marcate da ciascun anticorpo sono state contate in 10 campi selezionati (ingrandimento 40x) nelle seguenti aree: BALT, parete bronchiolare ed essudato nel lume, setti alveolari ed essudato. I risultati dell'analisi morfometrica sono stati espressi come media + deviazione standard (DS) di cellule positive / 1000 μm^2 .

I dati relativi alla gestione e alle vaccinazioni degli allevamenti sono stati messi in correlazione con la comparsa e la gravità della PEN mediante una regressione multipla semplificata "stepwise regression". I campi inclusi nell'analisi statistica hanno mostrato una percentuale di risposta di almeno il 75% una certa variabilità tra le risposte. Densità dei capi, ricorso al tutto pieno / tutto vuoto e vaccinazione contro il virus della malattia di Aujeszky, *Parvovirus*, *Actinobacillus Pleuropneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, rinite atrofica sono stati omessi seguendo i criteri precedenti in quanto non presentavano variabilità tra le risposte. Sono state eseguite due regressioni stepwise: la prima includendo tutti i dati presi in considerazione, la seconda sui dati risultanti a seguito di un'analisi di varianza e un odds ratio e scegliendo una probabilità di ingresso (PEn) di 0,250 e una probabilità di uscita (PEx). Un test del chi quadrato è stato inoltre eseguito per mettere in correlazione il punteggio istologico con la vaccinazione. L'importanza della differenza tra soggetti vaccinati e non vaccinati è stata valutata con l'analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SPSS Advanced Statistics 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significatività statistica è stata basata su un livello di significatività del 5% ($P < 0.05$).

Risultati

I polmoni affetti da PEN sono caratterizzati da polmonite catarrale nelle parti ventrale dei lobi cranici e medi e, quando la patologia è più grave, nella parte craniale del lobo caudale. Nella parte cranio-ventrale dei polmoni sono presenti aree di consolidamento di colore rosso scuro (acuto) a grigio (cronico), talvolta associate ad atelettasia o enfisema. I reperti tipici dello stato cronico sono le cosiddette "fessures", tessuto cicatriziale che solca il parenchima.

Dei 1103 polmoni esaminati, l'83,5% ha mostrato un punteggio polmonare inferiore a 4,

mentre il 16,5% superiore rispetto al *cut-off*. Il punteggio più alto osservato è stato pari a 15 ed è stato riscontrato due volte in polmoni provenienti da allevamenti non vaccinati. Punteggi polmonari inferiori a 4 sono stati associati alla vaccinazione contro *Mh* (19,0% vs 81,0%; $p < 0,01$).

I dati sulle aziende esaminate sono riepilogati nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche degli allevamenti esaminati

Table 1. Characteristic of examined swine farms

| Azienda | Tipologia | Peso di messa a terra (kg) | Ventilazione | Pavimentazione | Uso di mangime medicato | Segni clinici di PEN | Vaccinazione per <i>Mh</i> |
|---------|-----------|----------------------------|--------------|----------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | O | >30 | N | S&S | YES | YES | YES |
| 2 | C | ≤30 | N&F | S | YES | NO | YES |
| 3 | O | >30 | N&F | S&S | NO | NO | NO |
| 4 | O | >30 | N&F | S | YES | YES | YES |
| 5 | O | <30 | N&F | S | YES | YES | NO |
| 6 | O | <30 | N&F | S | YES | YES | NO |
| 7 | C | <30 | N&F | S | YES | NO | YES |
| 8 | C | <30 | F | S | YES | NO | YES |
| 9 | O | ≤30 | N | S | NO | NO | NO |
| 10 | O | >30 | N&F | S&S | YES | NO | NO |
| 11 | C | ≤30 | N | S&S | NO | YES | YES |
| 12 | C | ≤30 | N&F | S | YES | NO | YES |
| 13 | O | >30 | N | S | YES | NO | YES |
| 14 | O | >30 | N | S | YES | NO | NO |
| 15 | C | ≤30 | F | S | NO | YES | NO |
| 16 | C | <30 | F | S | YES | YES | NO |
| 17 | C | >30 | N | S | YES | NO | NO |
| 18 | C | ≤30 | N&F | S | YES | YES | NO |

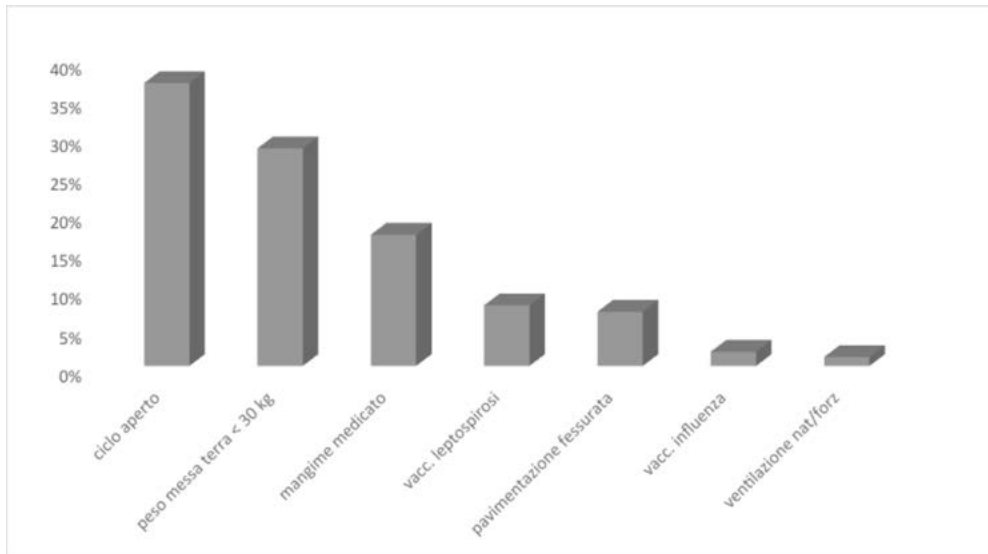
Note: Ciclo: O= Aperto, C= Chiuso; Ventilazione: N= Naturale, F= Forzata, N&F=Naturale e forzata; Pavimento: S=Fessurato; S&S= Fessurato e solido.

Note: Cycle: O= Open, C= Closed; Ventilation: N=Natural, F=Forced, N&F=Natural and forced; Floor: S=Slatted, S&S= Slatted and solid.

Il sistema di produzioni si è basato sul ciclo aperto in nove aziende e sul ciclo chiuso nelle restanti. La maggior parte degli allevamenti ha iniziato il finissaggio quando i suini pesavano meno di 30 kg (11 vs 8). La ventilazione era mista in metà dei lotti campionati, mentre i restanti hanno adottato solamente quella naturale o forzata. La pavimentazione è risultata fessurata e il mangime medicato veniva somministrato nella maggior parte degli allevamenti (14 contro 4). Nonostante l'elevata prevalenza, i sintomi clinici riferibili a *Mh* e la vaccinazione sono stati osservati solo nella metà delle aziende campionate. La regressione stepwise ha mostrato che il ciclo aperto, il peso di messa a terra inferiore a 30 kg, la presenza di pavimentazione fessurata, l'adozione di ventilazione sia naturale che forzata e la vaccinazione contro l'influenza e la leptospirosi sono i principali fattori che predispongono l'insorgenza della malattia (Figura 1).

Figura 1. Odds ratio del peso dei fattori di rischio con probabilità di entrata = 0,025 e probabilità di uscita= 0,01

Figure 1. Odds ratio of risk factors weight probability of entrance =0.025 and probability of exit =0.01



L'esame microscopico ha rilevato, in soggetti positivi alla PEN, una broncopolmonite con iperplasia del tessuto linfoide associato ai bronchi (Figura 2B), perdita di ciglia (Figura 2D), accumulo di cellule infiammatorie nei lumi e intorno alle vie aeree, alveolite istiocitica e ispessimento dei setti inter-alveolari (Figura 2F). Le percentuali dei punteggi delle lesioni istologiche raggruppate in score basso (0-1) e alto (2-3) sono riassunte nella tabella 2.

Figura 2. Polmoni di suino sani (A, C and F) e con lesioni associate a PEN (B, D and F). A) reazione infiammatoria ridotta attorno alle vie respiratorie (HE, Bar= 150 mm); B) marcata iperplasia peribronchiale del BALT (HE, Bar= 150 mm); C) epitelio bronchiale normale (HE, Bar= 25 mm); D) Perdita delle ciglia accompagnata da infiltrazione di linfociti nella mucosa bronchiale (HE, Bar= 25 mm); E) infiltrazione cellulare ridotta nei setti alveolari (HE, Bar= 150 mm); F) marcata cellularità dei setti alveolari con essudazione intralveolare (HE, Bar= 150 mm).

Figure 2. Lungs of pigs without (A, C and F) and with PEN-associated tissue changes (B, D and F). A) reduced inflammatory reaction around an airway (HE, Bar= 150 mm); B) marked peribronchial BALT hyperplasia (HE, Bar= 150 mm); C) normal bronchial epithelium (HE, Bar= 25 mm); D) loss of cilia accompanied by lymphocyte infiltration of bronchial mucosa (HE, Bar= 25 mm); E) reduced cellular infiltration of alveolar septa (HE, Bar= 150 mm); F) marked cellularity of alveolar septa with intra-alveolar exudations (HE, Bar= 150 mm).

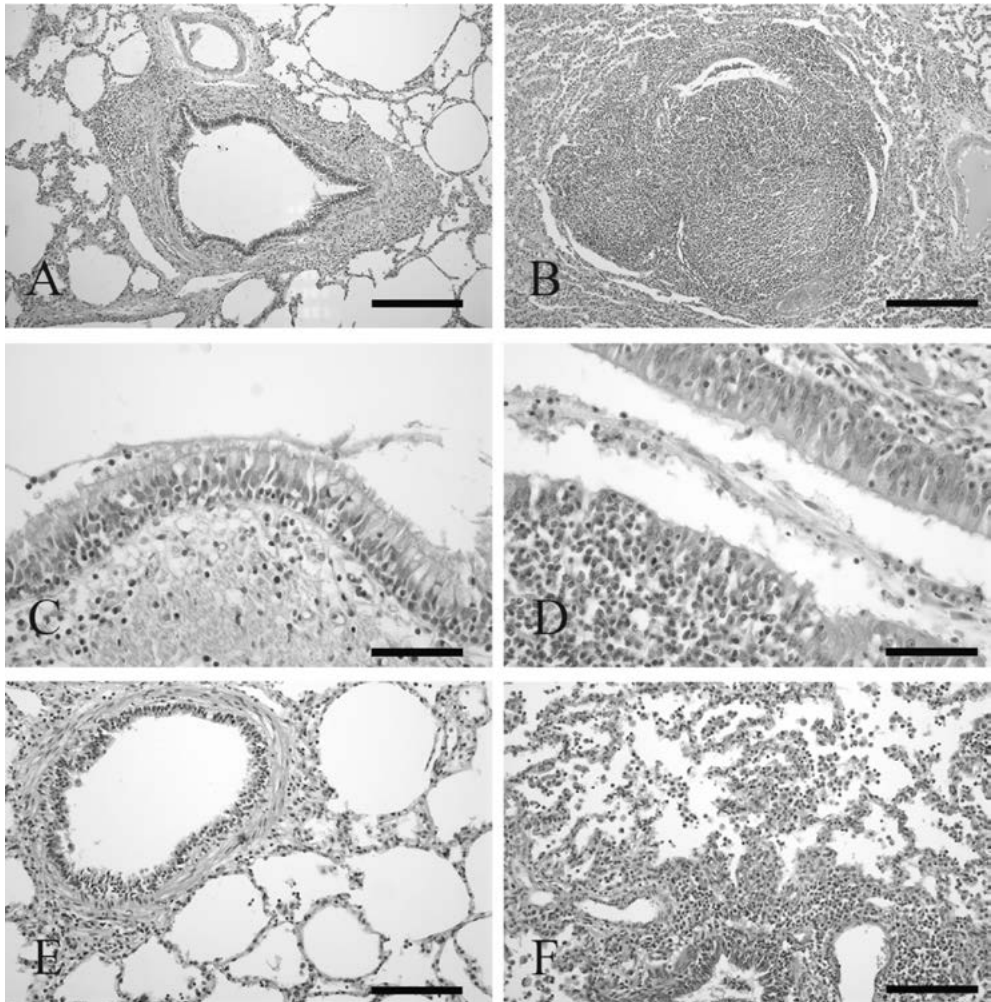


Tabella 2. Score istopatologico delle lesioni polmonari associate a PEN in soggetti vaccinati e non vaccinati per *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Table 2. Histopathologic score of PEN-associated lung lesions in subjects vaccinated and not vaccinated for *Mycoplasma hyopneumoniae*.

| Aziende | Ipereplasia BALT | | P | Essudato bronchiale | | P | Essudato alveolare | | P | Cellularità interstiziale | | P |
|-----------------------|------------------|---------|-------|---------------------|---------|-------|--------------------|---------|--------|---------------------------|---------|-------|
| | 0-1 (%) | 2-3 (%) | | 0-1 (%) | 2-3 (%) | | 0-1 (%) | 2-3 (%) | | 0-1 (%) | 2-3 (%) | |
| Vaccinati N=8 | 49 | 51 | <0.01 | 58 | 42 | <0.01 | 66 | 34 | <0.001 | 49 | 51 | <0.01 |
| Non vaccinati N=10 | 42 | 58 | | 49 | 51 | | 52 | 48 | | 42 | 58 | |

La correlazione tra la gravità dei risultati istologici e la vaccinazione rivela che i soggetti vaccinati hanno una iperplasia del BALT inferiore ($p < 0,01$), minor essudato bronchiale ($p < 0,01$), alveolare ($p < 0,001$) e cellularità interstiziale ($p < 0,01$).

A carico dei polmoni di suino con segni macroscopici e istopatologici di polmonite, è stata rilevata mediante immunoistochimica la presenza di antigeni *Mh* sulla superficie dei lumi bronchiali e bronchiolari, a differenza delle sezioni polmonari di soggetti senza polmonite.

L'immunolocalizzazione dei linfociti T CD3 +, B CD79a + e macrofagi Iba-1 + nei diversi distretti polmonari di soggetti vaccinati e non vaccinati è mostrata in Figura 3 e la conta delle cellule immunitarie in Tabella 3.

Figura 3. Immunolocalizzazione cellulare nel BALT (A-F) e negli spazi intralveolari (G-L) di soggetti vaccinati (A, B e C e G, H e I) e non vaccinati (D, E e F e J, K e L) con PEN. A, D, G e J) immunoreazione con anti CD3+ MoAb, Linfociti T negli infiltrati peribronchiali e nei setti alveolari (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm); B, E, H e K) immunoreazione con anti CD79a MoAb, linfociti B negli infiltrati peribronchiali e nei setti alveolari (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm); C, F, I and L) immunoreazione con anti Iba-1 MoAb, macrofagi negli infiltrati peribronchiali e nei setti (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm).

Figure 3. Immune cell immunolocalization in BALT (A-F) and inter-alveolar spaces (G-L) of vaccinated (A,B and C and G, H and I) and unvaccinated (D,E and F and J, K and L) pigs with PEN. A, D, G and J) immunolabeling with anti CD3+ MoAb, T lymphocytes scattered in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm); B, E, H and K) immunolabelling with anti CD79a MoAb, B lymphocytes in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm); C, F, I and L) immunolabeling with anti Iba-1 MoAb macrophages scattered in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm).

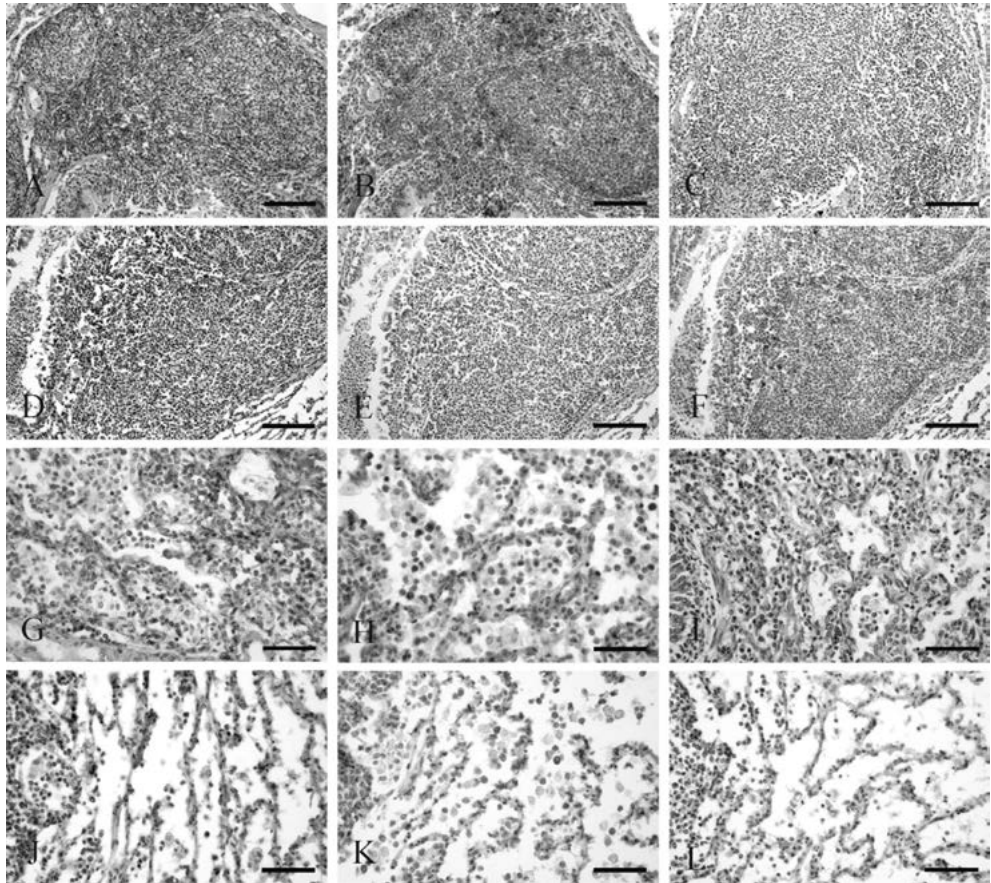


Tabella 3. Conta cellulare (cellule/1000 μm^2) in polmoni di suino vaccinati e non vaccinati con e senza lesioni associate a PEN

Table 3. Immune cell counts (cells/1000 μm^2) in lungs of vaccinated and unvaccinated pigs with and without PEN-associated lesions.

| Lesioni polmonari | BALT | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------|-------|-------------|---------------|--------|------------|---------------|--------|--|
| | Linfociti T | | P | Linfociti B | | P | Macrofagi | | P | |
| | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | |
| Assenti | 7.7 ± 2.3 | 6.0 ± 3.0 | NS | 5.6 ± 3.0 | 2.0 ± 2.0 | <0.001 | 1.5 ± 1.2 | 1.9 ± 1.3 | NS | |
| Presenti | 6.9 ± 2.3 | 5.7 ± 1.3 | NS | 1.3 ± 0.6 | 2.0 ± 0.8 | <0.002 | 1.5 ± 0.9 | 0.5 ± 0.2 | <0.001 | |
| | Parete bronchiale | | | | | | | | | |
| | Linfociti T | | P | Linfociti B | | P | Macrofagi | | P | |
| | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | |
| Assenti | 2.9 ± 1.4 | 2.9 ± 1.0 | NS | 1.3 ± 0.6 | 1.2 ± 0.3 | NS | 0.8 ± 0.5 | 2.1 ± 2.2 | NS | |
| Presenti | 1.8 ± 0.5 | 1.8 ± 0.7 | NS | 1.0 ± 0.9 | 1.6 ± 0.4 | 0.008 | 0.8 ± 0.4 | 0.5 ± 0.3 | 0.005 | |
| | Lume intra-bronchiale | | | | | | | | | |
| | Linfociti T | | P | Linfociti B | | P | Macrofagi | | P | |
| | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | |
| Assenti | 0.1 ± 0.1 | 0.2 ± 0.2 | NS | 0.2 ± 0.2 | 0.3 ± 0.2 | NS | 0.4 ± 0.4 | 0.1 ± 0.3 | NS | |
| Presenti | 0.1 ± 0.1 | 0.3 ± 0.2 | NS | 0.4 ± 0.4 | 0.6 ± 0.3 | NS | 0.4 ± 0.4 | 0.6 ± 0.5 | NS | |
| | Setti interalveolari | | | | | | | | | |
| | Linfociti T | | P | Linfociti B | | P | Macrofagi | | P | |
| | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | |
| Assenti | 2.9 ± 2.2 | 5.8 ± 2.9 | 0.002 | 5.5 ± 2.3 | 3.3 ± 1.0 | 0.001 | 4.4 ± 2.4 | 2.7 ± 2.0 | 0.026 | |
| Presenti | 24 ± 16.5 | 14.5 ± 4.6 | 0.024 | 8.1 ± 3.0 | 11.7 ± 5.0 | 0.025 | 11.2 ± 8.2 | 3.8 ± 1.4 | 0.001 | |
| | Spazi intra-alveolari | | | | | | | | | |
| | Linfociti T | | P | Linfociti B | | P | Macrofagi | | P | |
| | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | Vaccinati | Non Vaccinati | | |
| Assenti | 0.3 ± 0.2 | 0.2 ± 0.3 | NS | 0.4 ± 0.3 | 0.4 ± 0.3 | NS | 0.6 ± 0.3 | 0.9 ± 0.8 | NS | |
| Presenti | 0.9 ± 0.8 | 0.8 ± 0.5 | NS | 0.7 ± 0.7 | 0.7 ± 0.2 | NS | 1.1 ± 0.8 | 1.0 ± 0.9 | NS | |

Gli studi immunohistochimici hanno rivelato dei cambiamenti nella distribuzione delle cellule immunitarie nei soggetti sottoposti o meno alla vaccinazione con o senza alterazioni polmonari associate a PEN. Nei suini vaccinati senza lesioni polmonari si è verificato un aumento dei linfociti B nel BALT ($p < 0,001$) e a carico dei setti inter-alveolari ($p < 0,001$). In presenza di alterazioni polmonari associate alla PEN, i suini vaccinati hanno mostrato una diminuzione dei linfociti B nel BALT ($p < 0,002$), nella parete bronchiale ($p < 0,008$) e nei setti inter-alveolari ($p < 0,025$), un aumento del numero di linfociti T nei setti inter-alveolari ($p < 0,024$) e un numero maggiore di macrofagi nel BALT ($p < 0,001$), a carico della parete bronchiale ($p < 0,043$) e dei setti inter-alveolari ($p < 0,001$).

DISCUSSIONE

Attraverso la regressione stepwise il nostro studio ha confermato che il ciclo aperto è il principale fattore predisponente per la diffusione della PEN negli allevamenti suini (Mousing et al., 1990; Stark. 2000; Straw, 2006; Maes et al., 2008). Consentirebbe, infatti, la diffusione di agenti patogeni da una partita a un'altra, rendendo impossibile la costituzione di un'immunità di gruppo, in particolare negli allevamenti da ingrasso, i cui soggetti provengono da aree e contesti sanitari diversi. Al contrario, Backstrom e Bremere (1978), Scheidt et al., (1995), Stark et al. (1998) hanno suggerito che il ciclo chiuso possa influenzare la diffusione della PEN più di quello aperto. In particolare, Ostanello et al. (2006) hanno reputato la presenza di scrofe un importante serbatoio per l'infezione. Anche il peso di messa a terra è risultato essere un fattore importante: suinetti che intraprendono la fase di finissaggio con un peso inferiore a 30 kg sembrano essere più esposti all'infezione. Il finissaggio si configura, infatti, come un periodo di forte stress per i soggetti che in questa fase devono far fronte a diversi cambiamenti ambientali e alla formazione di nuovi gruppi di suinetti provenienti da scrofe diverse in cui si deve stabilire un equilibrio dipendente dall'instaurazione di una nuova gerarchia. Inoltre, nel nostro studio, il sistema ad accumulo e la ventilazione naturale e artificiale sono stati fattori rilevanti per l'insorgenza della PEN, perché legati a maggiori emissioni ammoniacali, che riducono l'attività ciliare delle cellule epiteliali (Bollwahn, 1989; Narita et al., 1995).

Il ricorso al mangime medicato e la vaccinazione contro la leptospirosi e l'influenza suina, i quali sono risultati statisticamente significativi, sono a nostro avviso da considerare come conseguenze della PEN e da escludere dai fattori di rischio, in quanto solitamente gli allevamenti di suini con malattie respiratorie fanno uso di antibiotici (Jouglar et al., 1993; Kavanagh et al., 1994; Le Grand e Kobish, 1996; Walter et al., 2000; Alexander et al., 1980) e vaccinazioni come profilassi per limitare la diffusione dei patogeni respiratori.

Il nostro studio ha confermato la presenza di alterazioni istologiche polmonari caratteristiche nei suini PEN-positivi: iperplasia del tessuto linfoide associato ai bronchi, perdita di ciglia ed esfoliazione delle cellule epiteliali nel lume dei bronchi, macrofagi, neutrofilii, a volte linfociti e plasmacellule infiltranti gli alveoli, ispessimento dei setti alveolari causato da edema, infiltrazione delle cellule infiammatorie e iperplasia e ipertrofia degli pneumociti di tipo II (Casalmiglia et al., 2000; Okada et al., 2000; Sarradell et al., 2003; Redondo et al., 2009; Hillen et al., 2014). Queste alterazioni istologiche correlano con la presenza di antigeni *Mh* nelle vie aeree di soggetti con PEN mentre, in accordo con altri studi, tali antigeni non sono stati rilevati all'interno delle cellule epiteliali, del BALT e dei macrofagi alveolari (Sarradell et al., 2003).

I soggetti vaccinati presentavano lesioni meno gravi rispetto a quelli non vaccinati a livello delle vie aeree polmonari e del parenchima (Casalmiglia et al., 2000). Il ridotto essudato bronchiale e alveolare e il minore spessore dei setti hanno dimostrato che la vaccinazione aiuta a ridurre le lesioni polmonari associate all'PEN, modulando la risposta immunitaria come testimoniato nei lavori di Thacker et al., 2000 e Otaka et al., 2000). Gli studi

immunoistochimici, condotti con lo scopo di caratterizzare la distribuzione delle cellule immunitarie, hanno rivelato che a livello del BALT dei suini vaccinati senza segni di polmonite è presente un numero superiore di linfociti B rispetto a quelli non vaccinati che testimonia lo sviluppo di una risposta immunitaria umorale locale. Al contrario, i soggetti vaccinati con lesioni polmonari associate alla PEN, confermate dalla presenza di antigeni *Mh*, hanno mostrato una riduzione delle cellule B. Precedenti studi hanno dimostrato che una risposta immunitaria locale sembra svolgere un ruolo essenziale nella protezione dalle infezioni da micoplasma (Cassel et al., 1974; Howard et al., 1987).

Il nostro studio, sebbene sia stato condotto in campo, riesce a dimostrare lo sviluppo di una risposta immunitaria umorale locale contro *Mh* in suini vaccinati naturalmente infetti. A conferma dell'importanza di questa risposta immunitaria, i soggetti vaccinati con alterazioni riferibili a PEN hanno mostrato una riduzione dei linfociti B nel BALT e nei setti alveolari. D'altra parte, in questi soggetti è risultato altresì evidente un aumento dei linfociti T e dei macrofagi nelle aree polmonari che presentavano delle alterazioni.

Questi risultati sembrano confermare che le lesioni caratteristiche sviluppate nella PEN sono associate ad un'attivazione delle cellule T (Tajima et al, 1984) e ad un aumento dei macrofagi (Otaka et al., 2000) che, attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie, portano ad un'esacerbazione della reazione infiammatoria.

Diversi studi hanno dimostrato come i macrofagi stimolati dalla presenza di antigeni *Mh* aumentino la produzione di queste citochine proinfiammatorie (Kwon et al., 2002, Sarradel et al., 2003, Rodriguez et al., 2004, 2007, Redondo et al., 2009).

In conclusione, questo studio condotto in condizioni di campo è riuscito a evidenziare i fattori di rischio che possono influenzare direttamente l'insorgenza della PEN, a confermare che la vaccinazione contro *Mh* può ridurre l'incidenza delle lesioni macroscopiche e istopatologiche indotte dall'agente patogeno e ha dimostrato come gli animali vaccinati sviluppino una risposta immunitaria locale a livello polmonare importante per prevenire alterazioni patologiche.

Inoltre, lo sviluppo di lesioni polmonari nei suini vaccinati sembra essere correlato allo sviluppo di una risposta immunitaria non protettiva mediata da linfociti T e macrofagi. Ulteriori indagini sono necessarie per identificare il fattore che regola la risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione e i fattori predisponenti responsabili di questa rottura dell'immunità. Senza dubbio la vaccinazione migliora le condizioni di salute nell'allevamento, ma l'eradicazione della PEN può essere raggiunta solo attraverso una buona gestione.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo il Dr. Giuseppe Baricco per i suoi preziosi consigli e supporto.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander T.L.J., Thornton K, Boon G. and Lysons R.J. (1980) "Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin". *Vet Rec*, 106, 114-9.
- Bäckström L., Bremer H. (1978) "The relationship between disease incidences of fatteners registered at slaughter and environmental factors in herds". *Nord Vet Med*, 30, 526-533
- Bollwahn W. (1989) "Infektiöse Faktorenkrankheiten beim Schwein Pathogenese und Bekämpfung". *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 102, 410-2.
- Calsamiglia M., Collins J.E., Pijoan C. (2000) "Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR". *Vet. Microbiol.*, 76, 299-303.
- Cassell GH., Lindsey JR., Baker HJ. (1974) "Immune response of pathogen-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*". *J Immunol*, 112, 124-136.

- Hillen S., von Bergc S., Köhlerb K., Reinacherb M., Willemsa H., Reiner G. (2014) "Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies". *Prev Vet Med*, 113, 580– 588.
- Howard C.J., Thomas L.H., Parson K.R. (1987) "Immune response of cattle to respiratory mycoplasmas". *Vet Immunol Immunopathol*, 17, 401-412.
- Jouglar J.Y., Borne P.M., Sionneau G., Bardon T., Eclach D., (1993) "Evaluation de l'interet de l'association tiamuline – oxytetracycline dans la prevention des bronchopneumonies du porc charcutier". *Rev Med Vet*, 144, 981 – 988.
- Kavanagh N.T. (1994) "The effect of pulse medication with a combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia". *Irish Vet J*, 47, 58 – 61.
- Kwon D., Choi C. and Chae C. (2002) "Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs". *Vet Pathol*, 39, 584 – 587.
- Le Grand A, Kobisch M. (1996) "Comparaison de l'utilisation d'un vaccin et d'un traitement antibiotique sequentiel dans un élevage infecte par *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet. Med.*, 27, 241-253.
- Madec F., Kobish M. (1982) "Bilan lesionnel des porcs charcutiers a l'abattoir". *Journées de la Recherche Porcine en France*, 14, 405-412.
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F. (2008) "Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs". *Vet. Microbiol.*, 126, 297-309.
- Mousing J., Lybye H., Barfod K., Meyling A., Ronsholt L., Willeberg P. (1990) "Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system related risk factors". *Prev Vet Med*, 9, 107–19.
- Narita M., Kawashima K., Morozumi T., Takashima H. (1995) "Effect of physical defences of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". *J Vet Med Sci*, 57, 839–44.
- Okada M., Asai T., Ono M., Sakano T., Sato S. (2000) "Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs". *Vaccine*, 18, 2825–2831.
- Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Sala V. (2006) "Utilizzo del punteggio polmonare (*lung score*) nei suini italiani: validazione del metodo, valutazione della prevalenza e dei fattori di rischio associati all'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Large animals review*, 12, 13-21.
- Redondo E., Masot A.J., Fernandez A., Gazquez A., (2009). "Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *J Com. Pathol* 140, 260 – 270.
- Rodriguez F., Ramirez G.A., Sarradell J., Andrada M., Lorenzo H. (2004) "Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*", *J Comp Pathol*, 130, 306 – 312.
- Rodriguez F., Quesada O., Poveda J.B., Fernandez A., Lorenz H., (2007). "Immunohistochemical detection of interleukin-12 and interferon-gamma in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *J Comp Pathol*, 136, 79 – 82.
- Sarradell J., Andrada M., Ramirez A.S., Fernandez A., Gomez-Villamandos J.C., Jover A. et al., (2003). "A morphological and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet Pathol*, 40, 395 – 404.
- Scheidt A, B., Cline T. R., Clark K., Mayrose V.B., Van Alstine, W.G., Diekman M.A., Singleton W.L., (1995). "The effect of all-in-all-out growing finishing on the health of pigs. *J Swine Health Prod*, 3, 202 – 205.

- Stärk K.D.C., Pfeiffer D.U., Morris R.S. (1998) "Risk factors for respiratory diseases in New Zealand pig herds". *N Z Vet J*, 46, 3–10.
- Stärk K.D.C. (2000). "Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine - A Literature Review". *Vet J*, 159, 37–56.
- Straw B.E., Zimmermann J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (2006) "Diseases of Swine", 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 1075–1098.
- Tajima M., Yagihashi T., Nunoya T., Takeuchi A., Ohashi F. (1984) Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunodepressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *Am J Vet Res*, 45, 1928 – 1932.
- Thacker E.L., Thacker B.J., Kuhn M., Hawkins P.A., Waters W.R. (2000) "Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs". *Am. J. Vet. Res.*, 61, 1384- 1389.
- Walter D., Holck J.T., Sornsen S., Hagen C., Harris I.T. (2000) "The effect of a metaphylactic pulse dosing infeed antimicrobial strategy on finishing pig health and performance" *Swine Health Prod.*, 8, 65 – 71.