



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA
ESPERIENZA,
LA VOSTRA
SICUREZZA.

FORME ENTERICHE NEL SUINETTO SOTTO-SCROFA: DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE E TECNICHE DI CAMPIONAMENTO

Andrea Luppi, DVM, PhD, Dipl. ECPHM

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

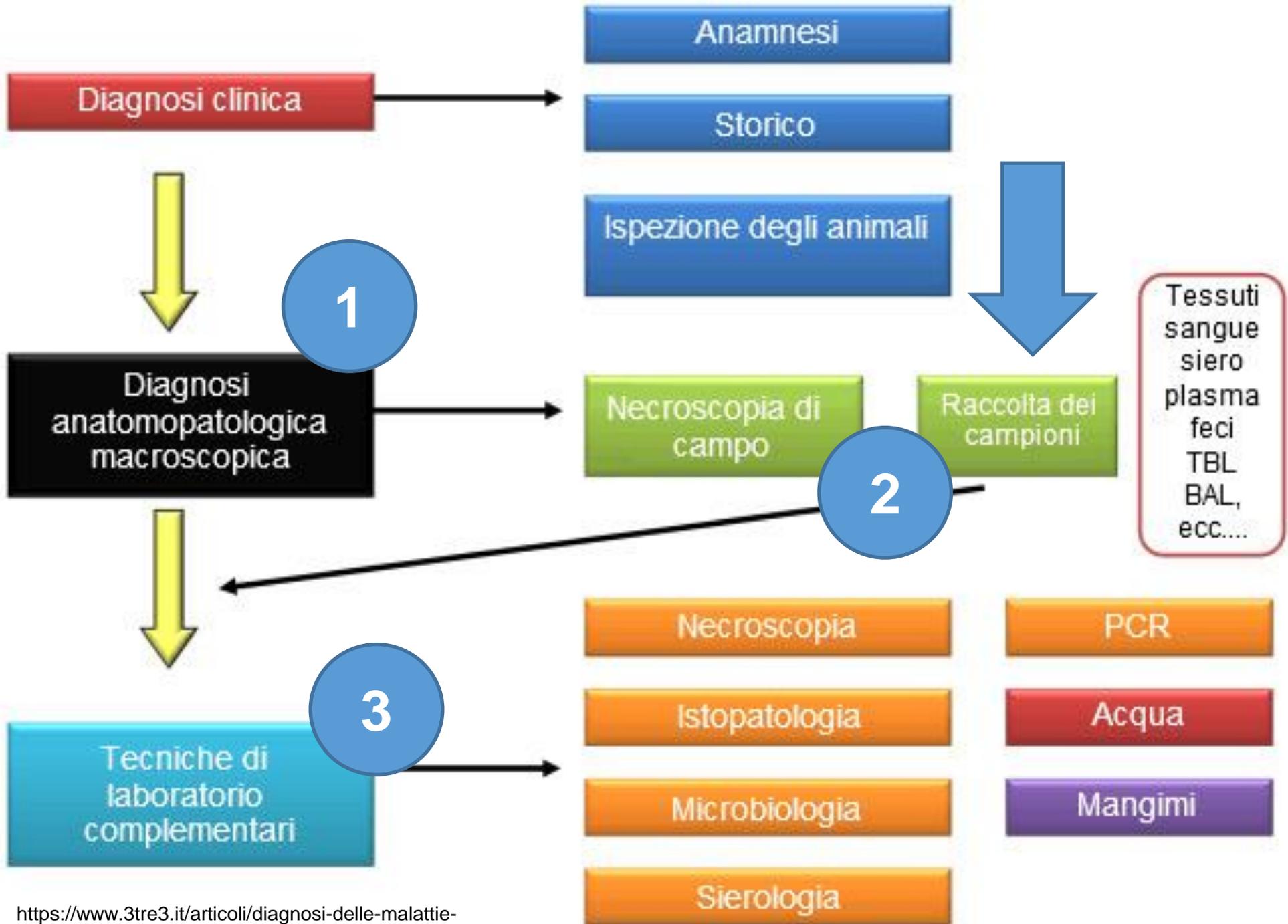


DIAGNOSI



Processo di verifica della **presenza di un agente patogeno** associato a quadri clinici ed anatomo-isto-patologici, che porta ad una diagnosi eziologica.

Deve sottostare a definiti criteri diagnostici.





MALATTIA ENTERICA: CAMPIONAMENTO

Dal campionamento **dipende** gran parte del successo dell'iter diagnostico

La **risposta ad alcune domande** dovrebbe aiutare ad un corretto campionamento:

Le **procedure di campionamento** sono **standardizzate, codificate e adeguate** rispetto al sospetto clinico e al quadro anatomopatologico osservato?

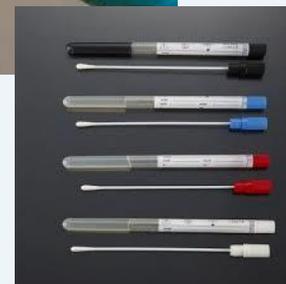
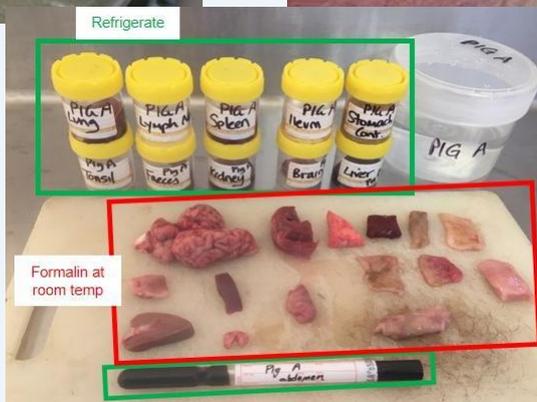
Le **quantità** necessarie per l'esecuzione degli esami e le modalità di **conservazione** sono idonee?

Sono state considerate le indagini diagnostiche **d'elezione** e quelle **complementari**?

Malattia/agente	Approccio diagnostico d'elezione	Analisi complementare
Colibacillosi (<i>Escherichia coli</i>)	Isolamento microrganismo Genotipizzazione (tossine e fimbriae)	Istopatologia
Porcine epidemic diarrhoea (PED) - Coronavirus	Istopatologia Dimostrazione del patogeno (PCR, IHC)	-
Clostridiosi <i>Clostridium perfringens</i> Tipo C	Isolamento (quantificazione) Genotipizzazione	Istopatologia
Clostridiosi <i>Clostridium perfringens</i> Tipo A	Isolamento (quantificazione) Genotipizzazione	Istopatologia
Clostridiosi <i>Clostridium difficile</i>	Isolamento Dimostrazione tossine TcdA e/o TcdB Istopatologia	-
Rotavirusi Rotavirus	Istopatologia Dimostrazione del patogeno (PCR, IHC)	-
Coccidiosi (<i>Cystoisospora suis</i>)	Flottazione, Istopatologia	Modificato da Ségales et al., 2014



MALATTIA ENTERICA: CAMPIONAMENTO



**Esame
anatomopatologico**

+4°C

**Esame
parassitologico**

+4°C

**Esame
virologico**

-20°C

**Esame
batteriológico**

+4°C

**Esame
istologico**

+4°C



ESAME BATTERIOLOGICO e VIROLOGICO

- N
- S
- n
- c
- n
- s
- d
- C
- (-

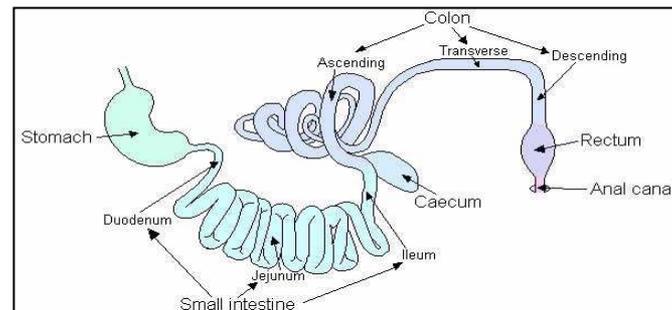
4 ore a T° ambiente
(28°C)

am
alat
ter
viro
ione

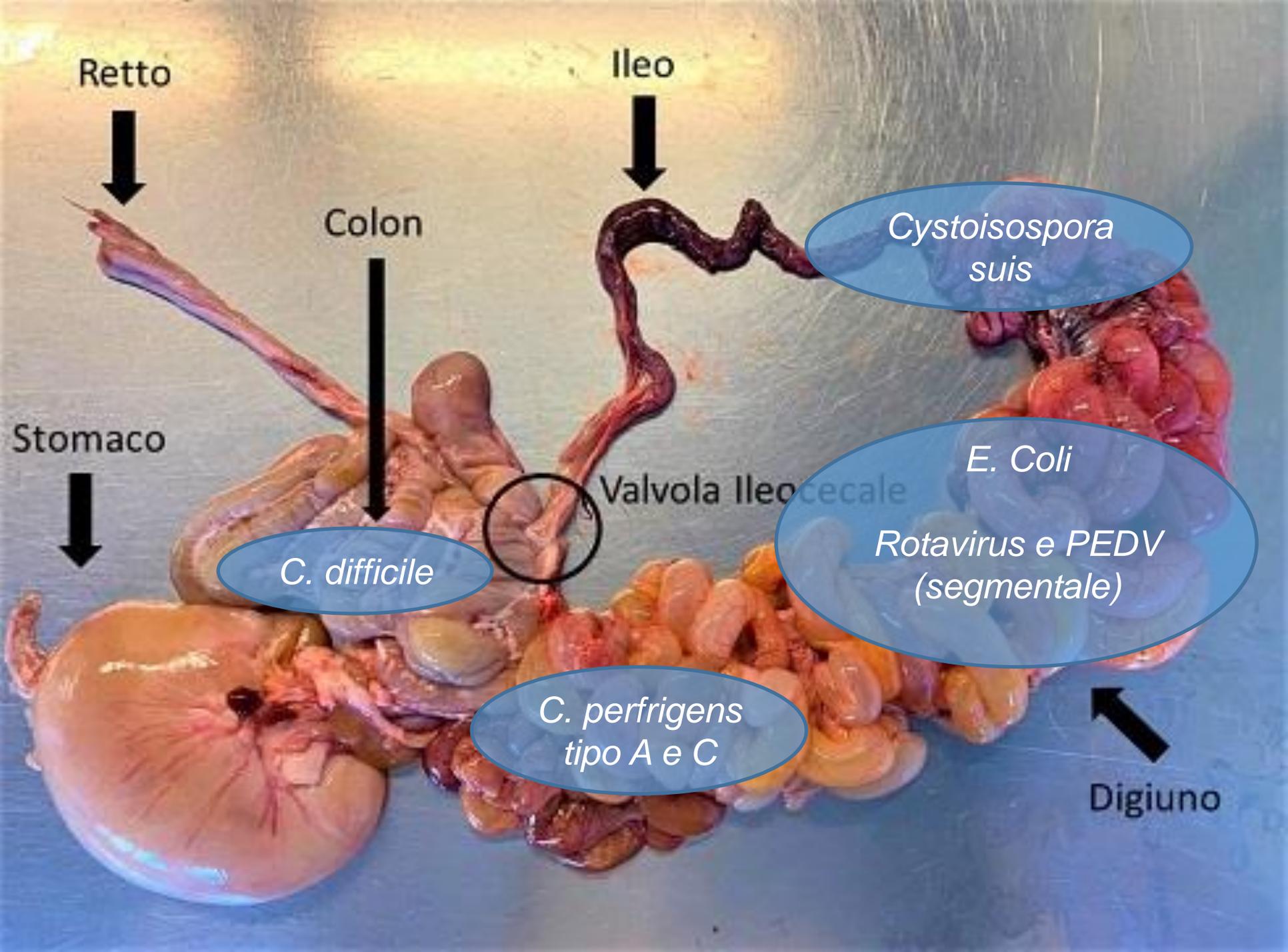


MALATTIA ENTERICA: ESAME ISTOLOGICO

Tessuto/campione	Forma enterica
Linfonodi	Mesenterici 1 cm di spessore
Tonsille	Prelevare metà tonsilla
Milza	1 cm di spessore
Fegato	2x2x0.5 cm
Stomaco	3x3x1 cm
Digiuno	3 sezioni, 2 cm di lunghezza
Ileo	3 sezioni, 2 cm di lunghezza
Cieco e Colon spirale	3 sezioni, 2 cm di lunghezza



:10
0,8





DIAGNOSI MALATTIE ENTERICHE: CRITICITA'

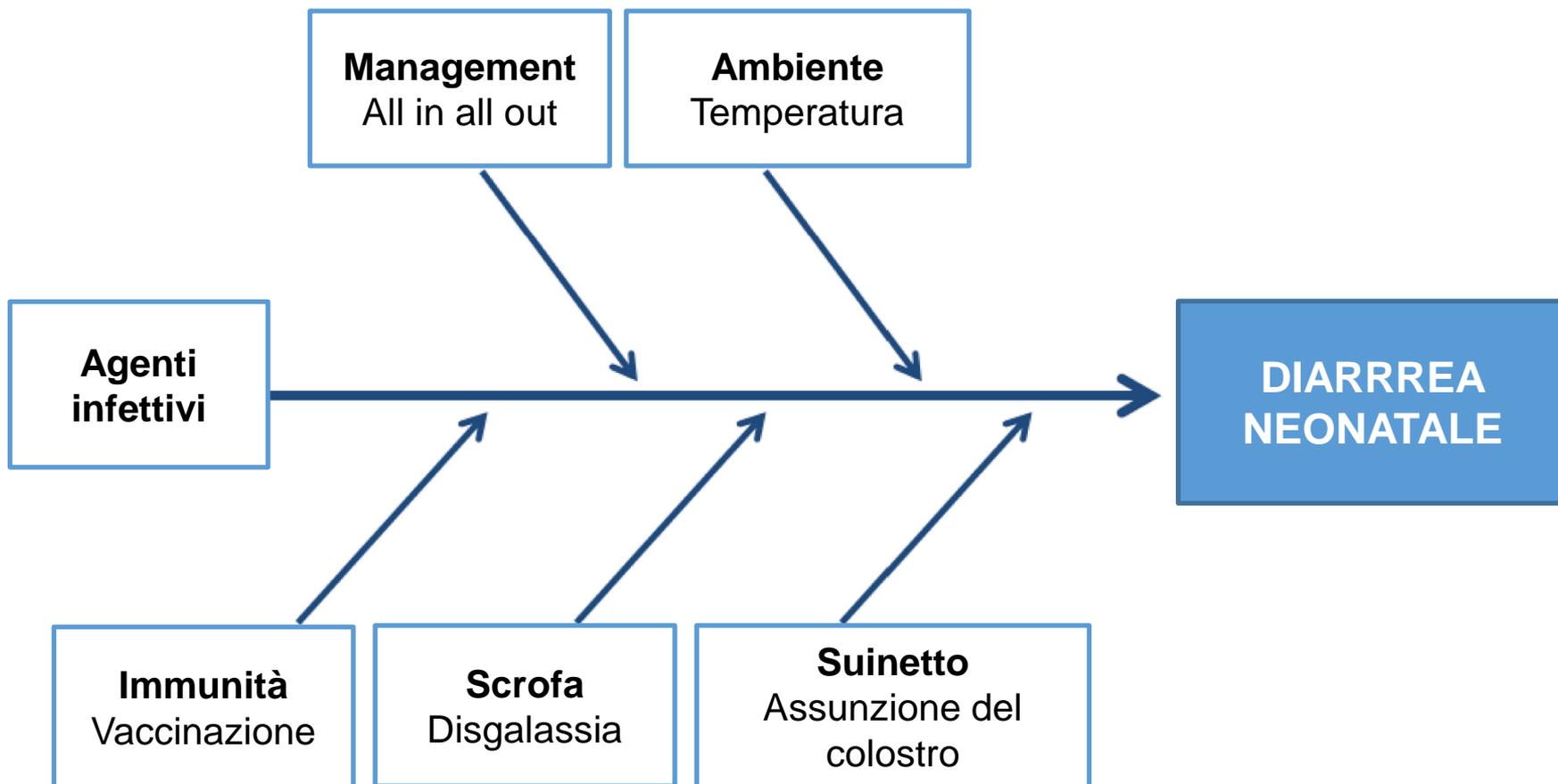




DIAGNOSI MALATTIA ENTERICA: CRITICITA'



- **Multifattoriale condizionata**

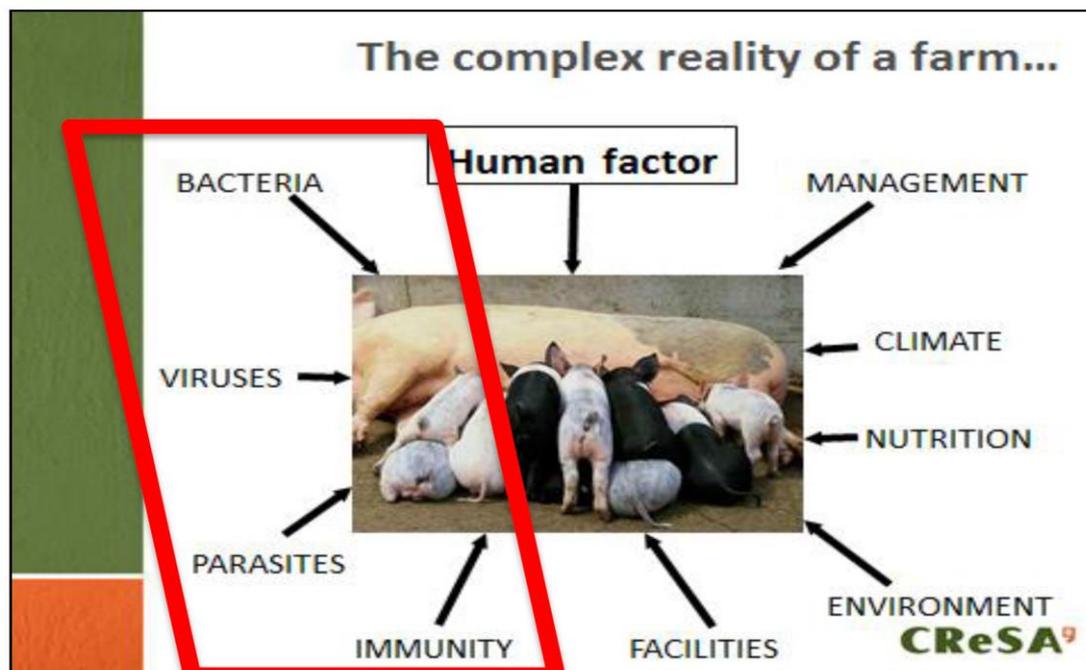




CRITICITA'



Le malattie **infettive/contagiose** sono percepite come le più importanti.
Normalmente la prima domanda di fronte a un problema sanitario è:
"Qual'è l'agente patogeno causale ?"





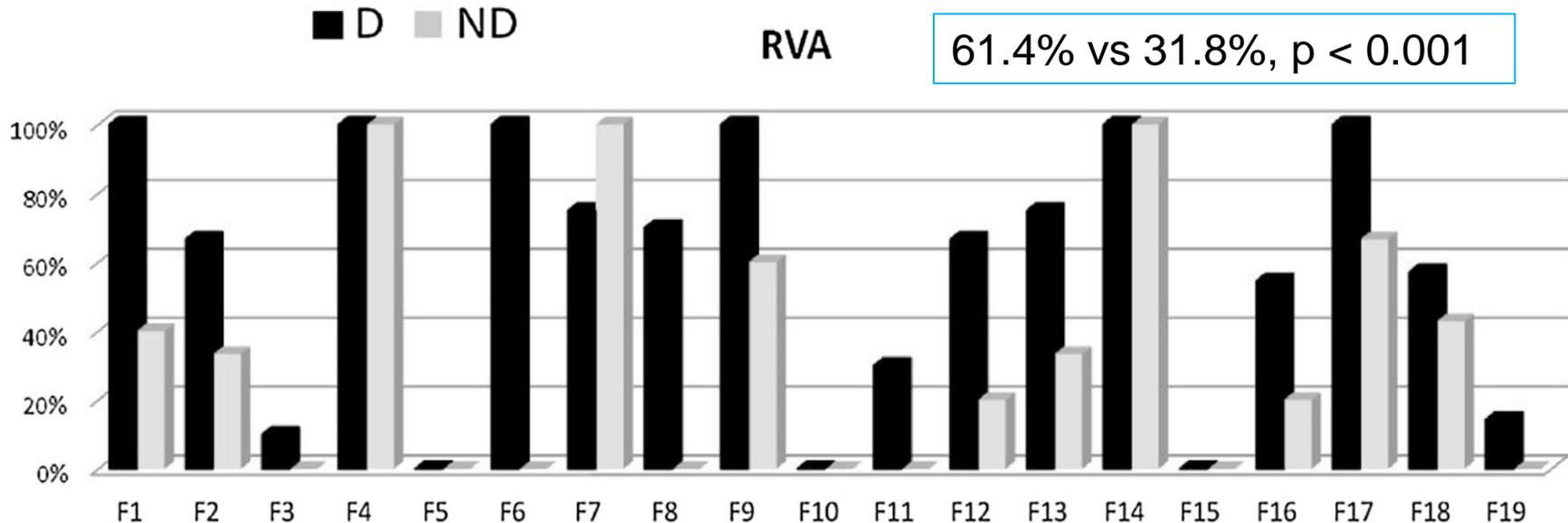
Country	Year	Diagnostic test	Age (days)	Symptoms	n=	% RVA positive	Reference
USA, Canada, Mexico	2009-2011	RT-qPCR	1-3	D	954	30%	[62]
			4-21	D	2144	46%	
			22-55	D	2538	84%	
			>55	D	1207	61%	
Argentina	1999	PAGE + antigen EIA	<45	ND	901	3.3%	[63]
Canada	2005-2007	RT-PCR	Slaughter	ND	96	8.3%	[64]
			>24	ND	50*	16.0%	
Denmark	2006-2007	EIA	1-28	D	308	10%	[65]
Germany	nd	EM	1-21	D	102	2.0%	[66]
Italy	2004-2006	RT-PCR	28-84	D	102	71.5	[67]
Ireland	2005-2007	RT-PCR	28-63	ND	292	6.5%	[68]
Slovenia	2004-2005	RT-PCR	1-21	D	6	50%	[69]
				ND	121	11.6%	
			22-70	D	14	35.7%	
				ND	133	25.6%	
			>70	D	13	46.2%	
Japan	2000-2002	PAGE	suckling	D	36	18 outbreaks	[70]
			weaning				
South Korea	2006-2007	nested RT-PCR	3-70	D	475	38.3%	[71]
Thailand	2000-2001	antigen EIA	7-49	D	175	22.3%	[72]
Vietnam	2012	RT-qPCR	all ages	D	76	19.7%	[73]
				ND	654	24.9%	

Legend: D diarrheic; ND non-diarrheic; EIA enzyme immunoassay; EM electron microscopy; PAGE polyacrylamide gel electrophoresis; * mixed samples from multiple animals



Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain

Anna Vidal^{a,*}, Gerard E. Martín-Valls^a, Montse Tello^a, Enric Mateu^{a,b}, Marga Martín^{a,b,1},
Laila Darwich^{a,b,1}





RESEARCH

Open Access



Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings

Hanne Kongsted^{1,2*} , Karl Pedersen³, Charlotte Kristiane Hjulsgaard³, Lars Erik Larsen³, Ken Steen Pedersen², Sven Erik Jorsal³ and Poul Bækbo²

In totale, 268 suini arruolati nello studio provenienti da 60 allevamenti Danesi:

- 171 diarroici (diagnosi anatomopatologica di enterite)
- 97 non diarroici (assenti lesioni intestinali)

	Case piglets (n = 171)	Control piglets (n = 97)	P-value*
<i>C. difficile</i>	111 (65%)	55 (57%)	0.2
CpA cpb2	157 (96%)	90 (97%)	1
<i>E. hirae</i> present	76 (44%)	42 (43%)	0.9
Massive growth of <i>E. hirae</i>	28 (16%)	9 (9%)	0.1
Rotavirus A	42 (25%)	6 (6%)	< 0.001

*Two-sided Fisher's exact test



PRINCIPALI MALATTIE ENTERICHE DEL SUINO



Età

Sottoscrofa **Svezzamento** Accr./ingrasso Adulti

E.coli *E.coli* *E.coli*

C.perfringens C

C.difficile

Enterococcus sp.

Cystoisospora suis

Rotavirus

C.perfringens A

TGE

PED

L. intracellularis

L. intracellularis

Salmonella spp.

Brachyspira spp.





ESCHERICHIA COLI PATOGENI: CLASSIFICAZIONE

Rhouma et al. *Acta Vet Scand* (2017) 59:31
DOI 10.1186/s13028-017-0299-7

Acta Veterinaria Scandinavica

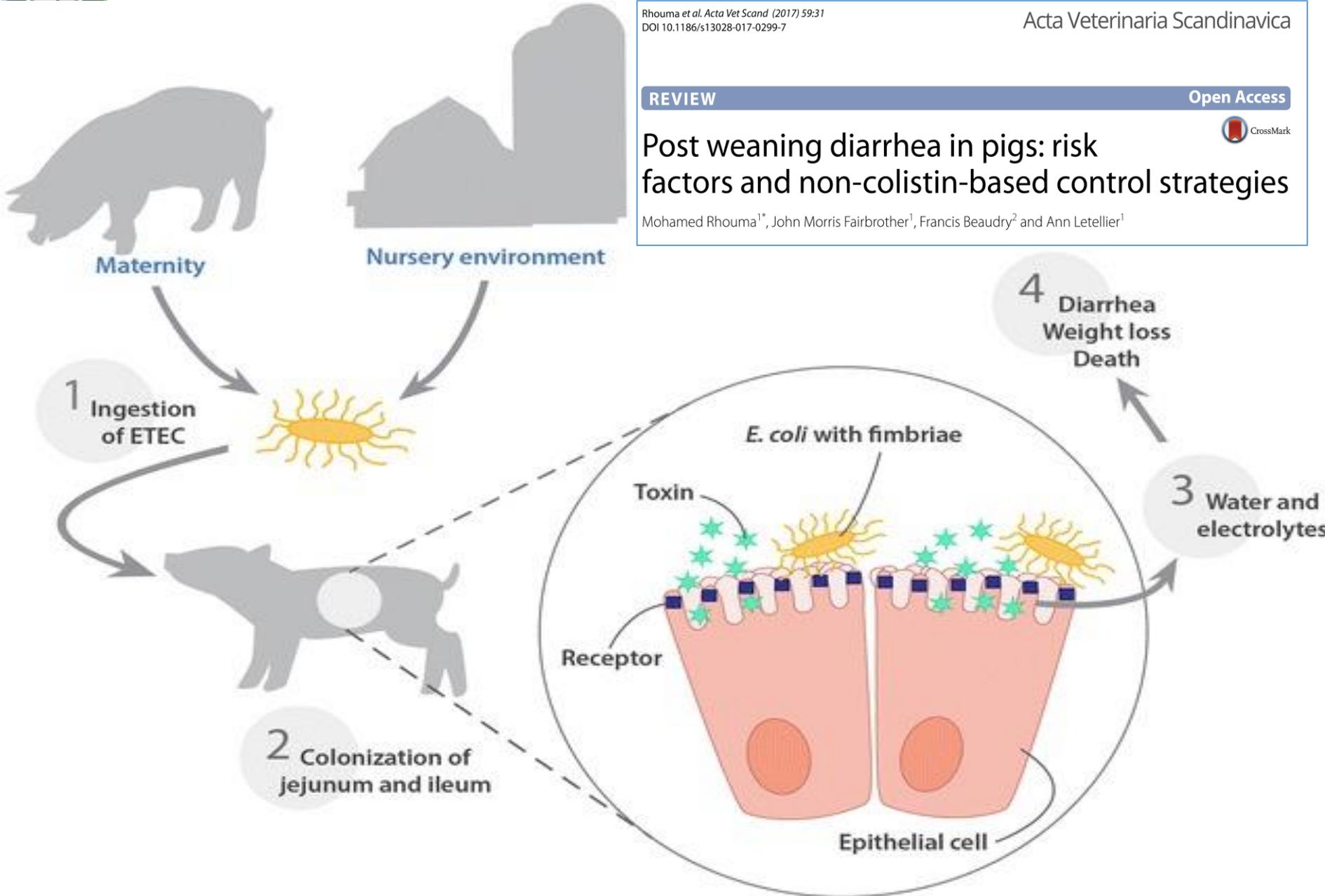
REVIEW

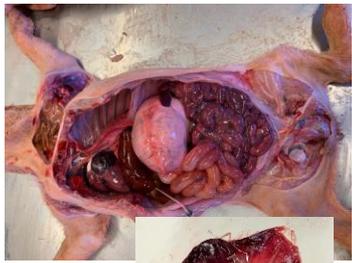
Open Access



Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies

Mohamed Rhouma^{1*}, John Morris Fairbrother¹, Francis Beaudry² and Ann Letellier¹





Segni clinici compatibili con diarrea dovuta a colibacillosi da ETEC (suinetti di 0-4 gg di vita)

Necropsia e valutazione delle lesioni anatomopatologiche in 3-5 suinetti

Campionamento: intestini, feci, tamponi rettali



Gold standard per la diagnosi

Analisi complementare (su tessuti fissati in formalina)

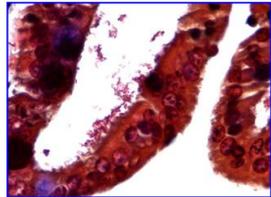
Batteriologia semi-quantitativa

Istopatologia
Colorazione di Gram

Sono rispettati criteri quantitativi (*E.coli* coltivati in coltura pura)?

si

Tipizzazione



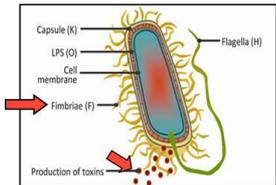
no



PCR geni fimbrie e tossine

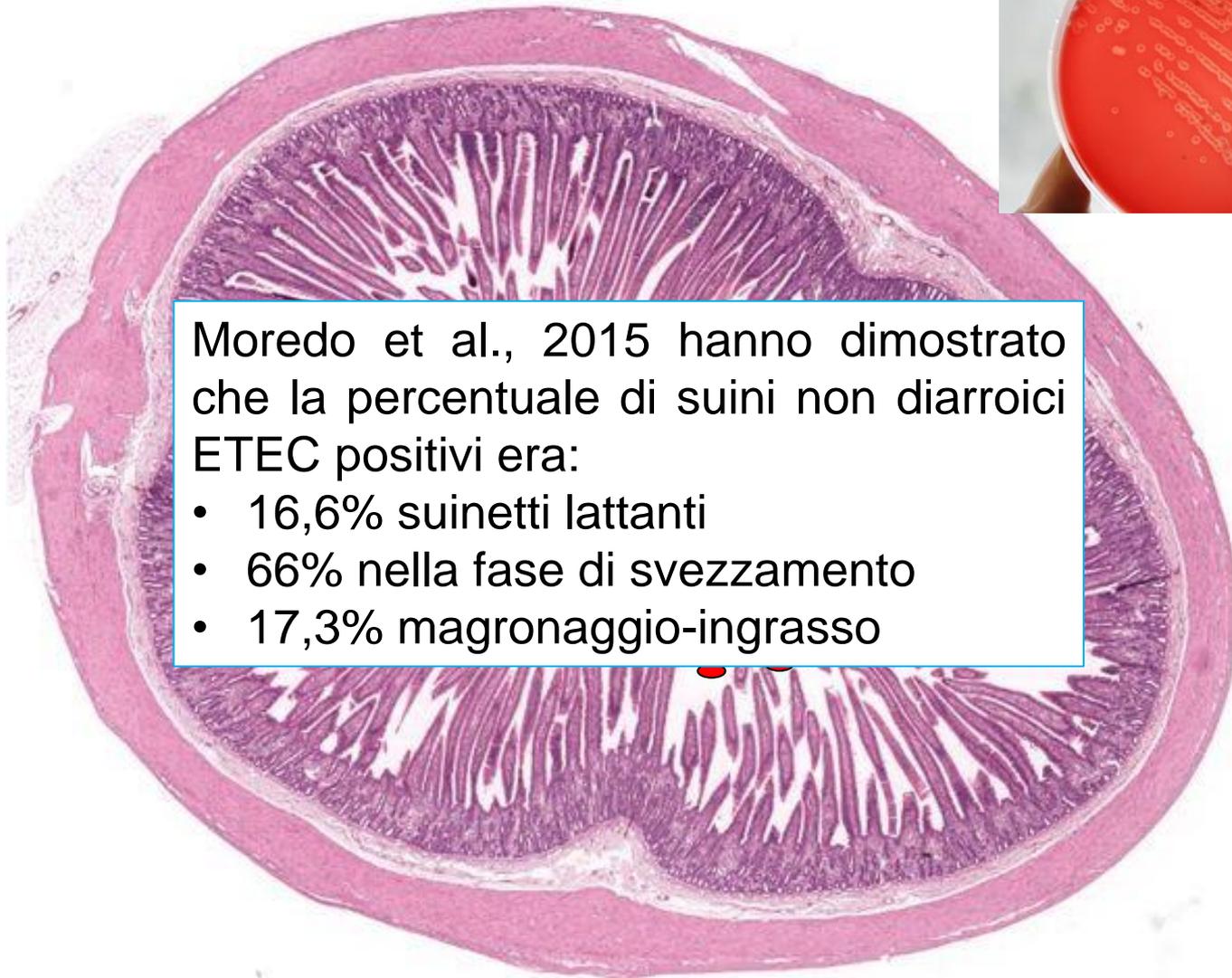
Presenza: colibacillosi dovuta ad ETEC confermata

Criteria diagnostici per la diagnosi di colibacillosi non rispettati





PERCHÉ È IMPORTANTE LA “QUANTIFICAZIONE” DI *E. COLI* PATOGENO ISOLATO

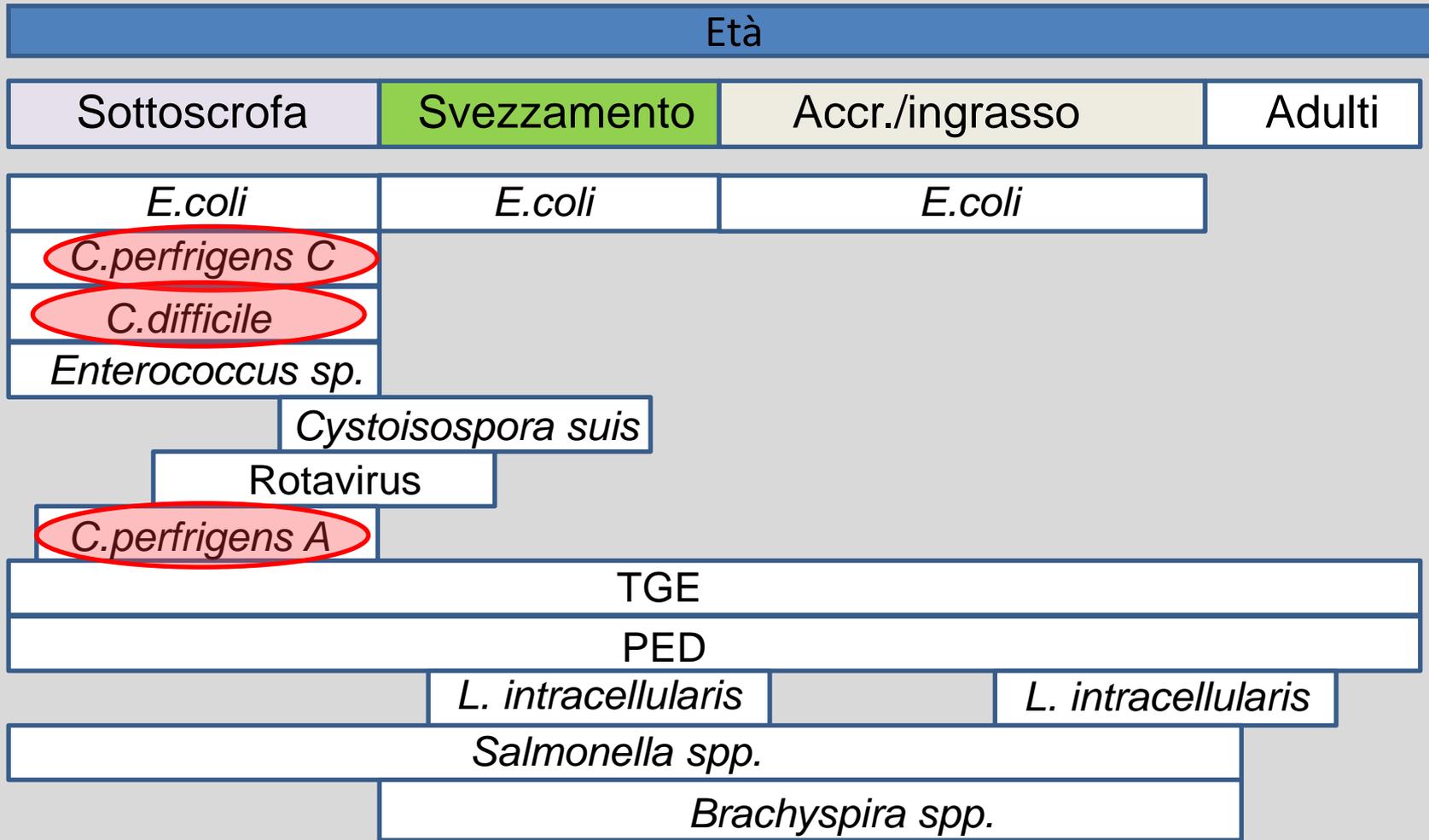


Moredo et al., 2015 hanno dimostrato che la percentuale di suini non diarroici ETEC positivi era:

- 16,6% suinetti lattanti
- 66% nella fase di svezzamento
- 17,3% magronaggio-ingrasso



PRINCIPALI MALATTIE ENTERICHE DEL SUINO

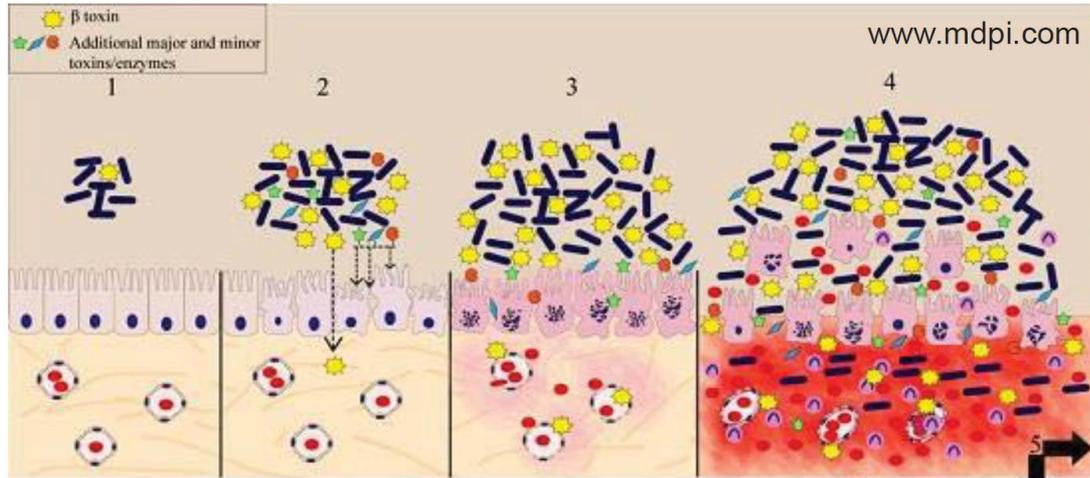




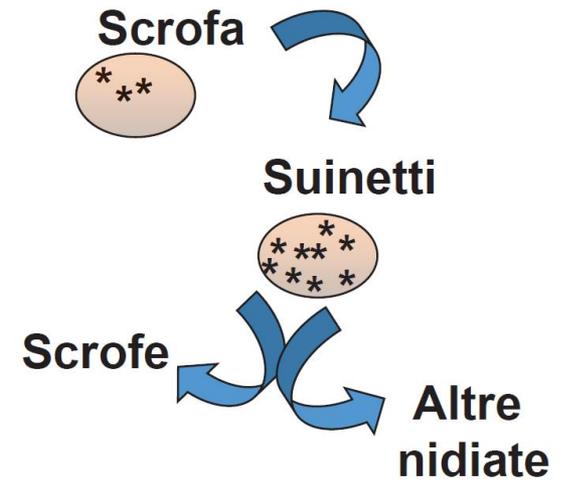
CLOSTRIDIOSI



<http://textbookofbacteriology.net/>



10^8-10^9 UFC/gr. feci





CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici



Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>C.perfringens</i> tipo C	PA: 1 gg A: 3 gg SA: 7 gg C: 10-14 gg	PA: acquosa con sangue A: bruna con sangue SA: acquosa grigio-gialla C: grigio-gialla	Digiuno ed ileo Enterite emorragica Ascite	100% nella forma PA e A	Esame colturale Genotipizzazione (Istopatologia)

Enterite necrotico emorragica segmentale o diffusa



Tossine: Alfa-beta-beta2



CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici



Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>C.perfringens</i> tipo A	PA: 1 gg A: 3 gg SA: 7 gg C: 10-14 gg	Mucoide, rosa senza sangue	Digiuno ed ileo Presenza di membrane necrotiche	Bassa se non complicata	Esame colturale Genotipizzazione (Istopatologia)

Enterite necrotizzante



Tossine: Alfa-beta2





CONFERMA DI LABORATORIO



Campionamento:

- piccolo intestino
- contenuto intestinale/feci

(*Clostridium perfringens*)

• Isolamento e conta

$10^6 - 10^7$ UFC/gr



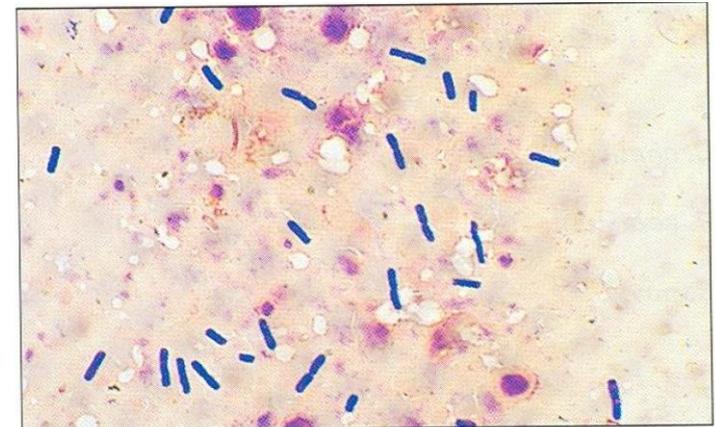
(Rosignoli, 2013)

- **Genotipizzazione:** geni codificanti le principali tossine



Tipo C	Alfa + Beta +Beta2
Tipo A	Alfa + Beta2

- **Istopatologia**





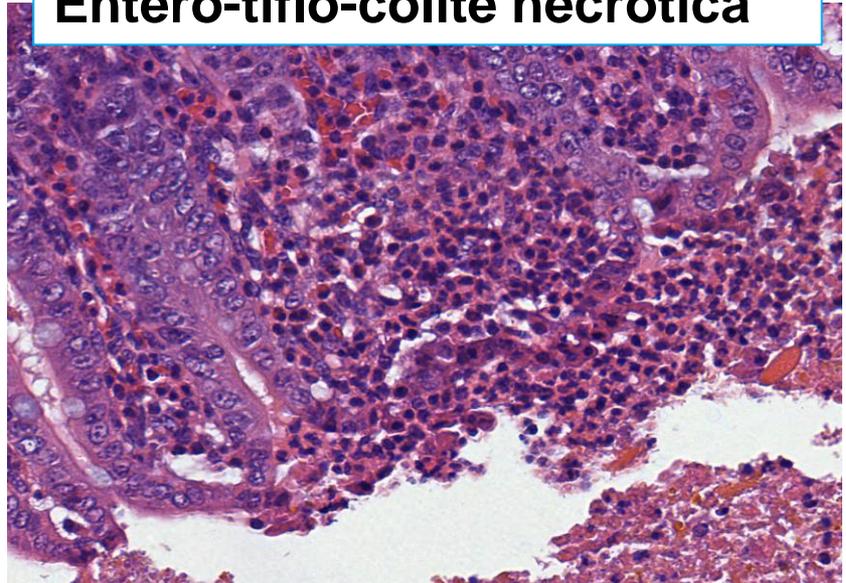
CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici

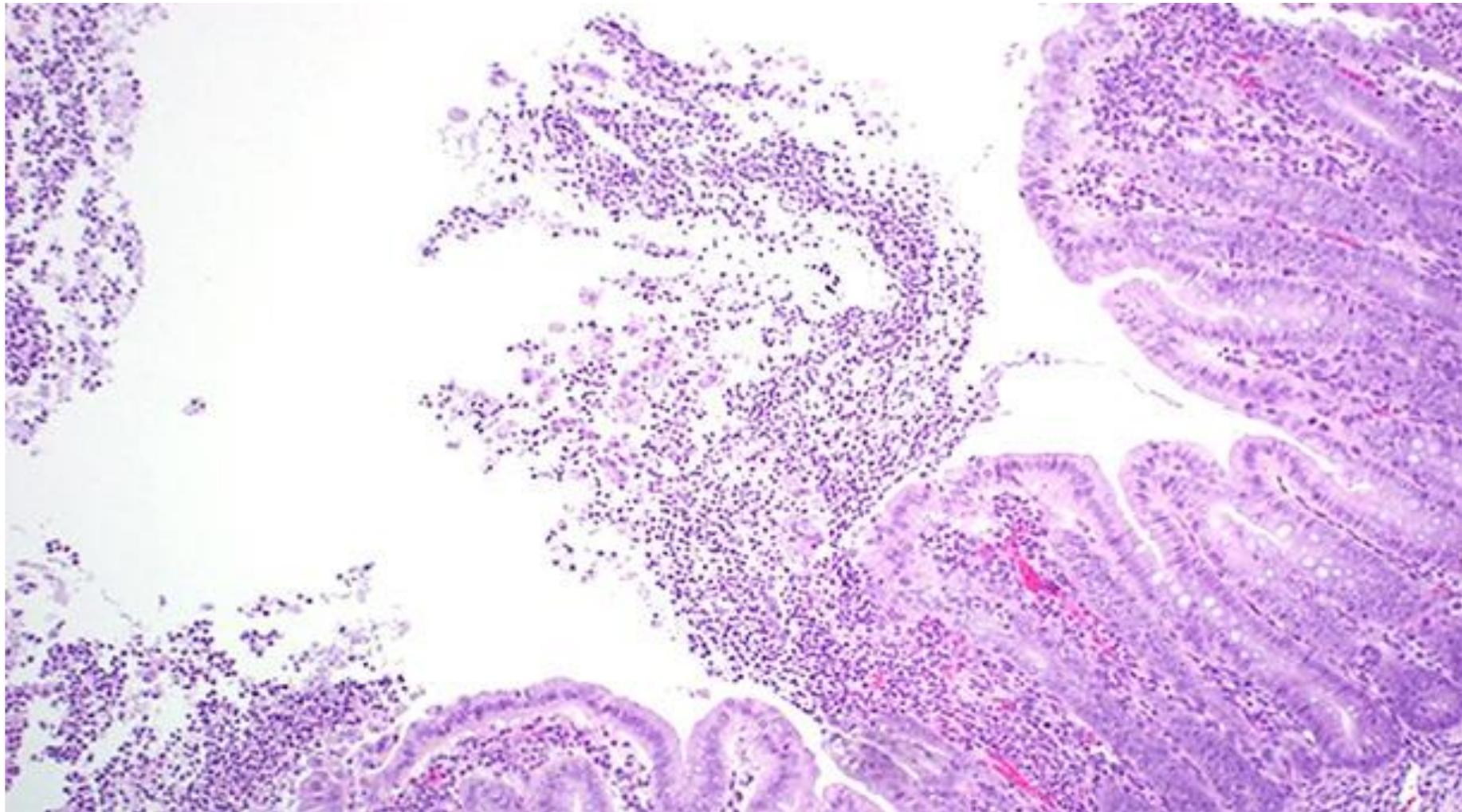


Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>Clostridium difficile</i>	Nella prima settimana di vita	Cremosa e gialla	Edema del mesocolon Tiflocolite con erosioni focali	Variabile. Fino al 50%	Esame colturale Identificazione della tossina Istopatologia



Entero-tiflo-colite necrotica





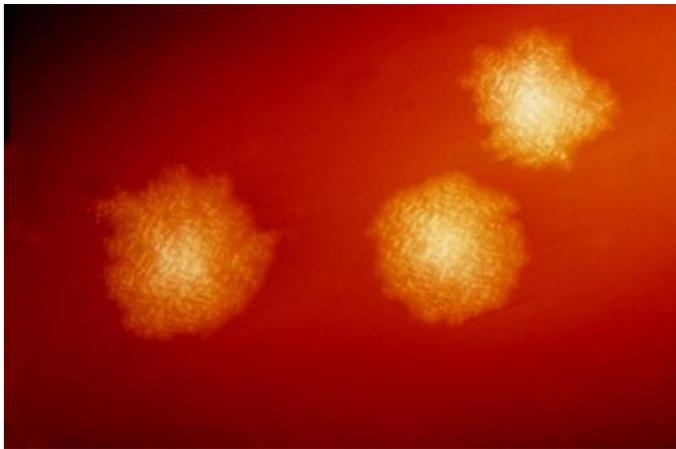


CONFERMA DI LABORATORIO



Campionamento: Colon

Approccio diagnostico: batteriologia, ricerca geni per le tossine TcdA, TcdB e CDT; istopatologia (campione refrigerato)



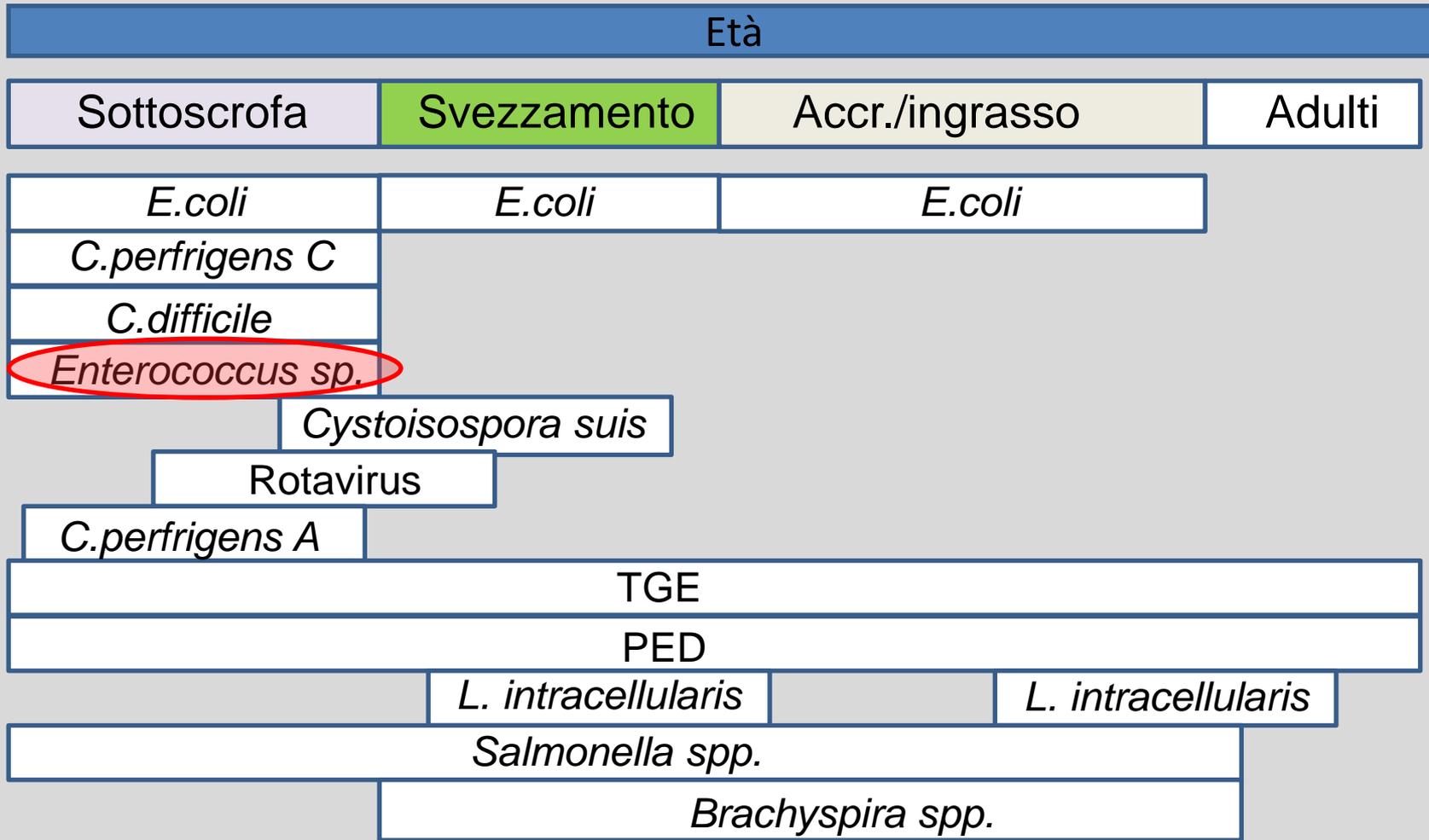
Dimostrazione delle tossine TcdA
e/o TcdB
(Tossine termolabili – campione
congelato)

Primavilla et al., 2018

Importante associare i risultati di laboratorio con i rilievi clinici ed anatomopatologici data la frequente presenza di *C.difficile* in feci di animali clinicamente sani.



PRINCIPALI MALATTIE ENTERICHE DEL SUINO





INFECTIOUS DISEASE

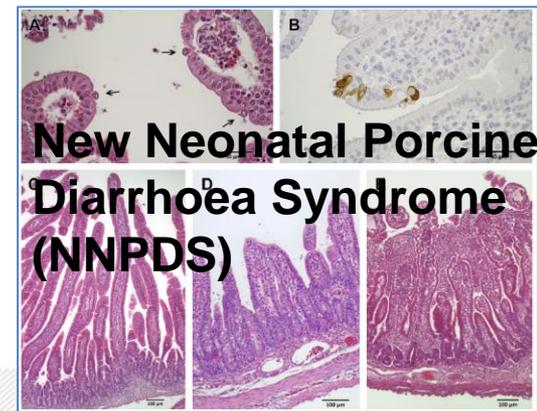
Neonatal Piglet Diarrhoea Associated with Enteroadherent *Enterococcus hirae*

J. Larsson^{*}, R. Lindberg[†], A. Aspán[‡], R. Grandon[†], E. Westergren[‡]
and M. Jacobson^{*}

6 allevamenti
18 suinetti diarroici
11 suinetti controllo

Table 2
Histopathological findings in the small intestine of diarrhoeic and healthy neonatal piglets from six herds (n = 29)

<i>Lesion*</i>	<i>Diarrhoeic animals</i> n = (%)	<i>Control animals</i> n = (%)
Enteroadherent cocci	18 (100)	0 (0)
Epithelial lesions	10 (56)	0 (0)
Microthrombi in villus tips [‡]	3 (17)	0 (0)
Villus:crypt ratio ≤3:1 [‡]	4 (22)	0 (0)



New Neonatal Porcine Diarrhoea Syndrome (NNPDS)



PRINCIPALI MALATTIE ENTERICHE DEL SUINO



<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
---------------	---------------	---------------

<i>C.perfringens C</i>

<i>C.difficile</i>

<i>Enterococcus sp.</i>

<i>Cystoisospora suis</i>

Rotavirus

<i>C.perfringens A</i>

TGE

PED

<i>L. intracellularis</i>

<i>L. intracellularis</i>

<i>Salmonella spp.</i>

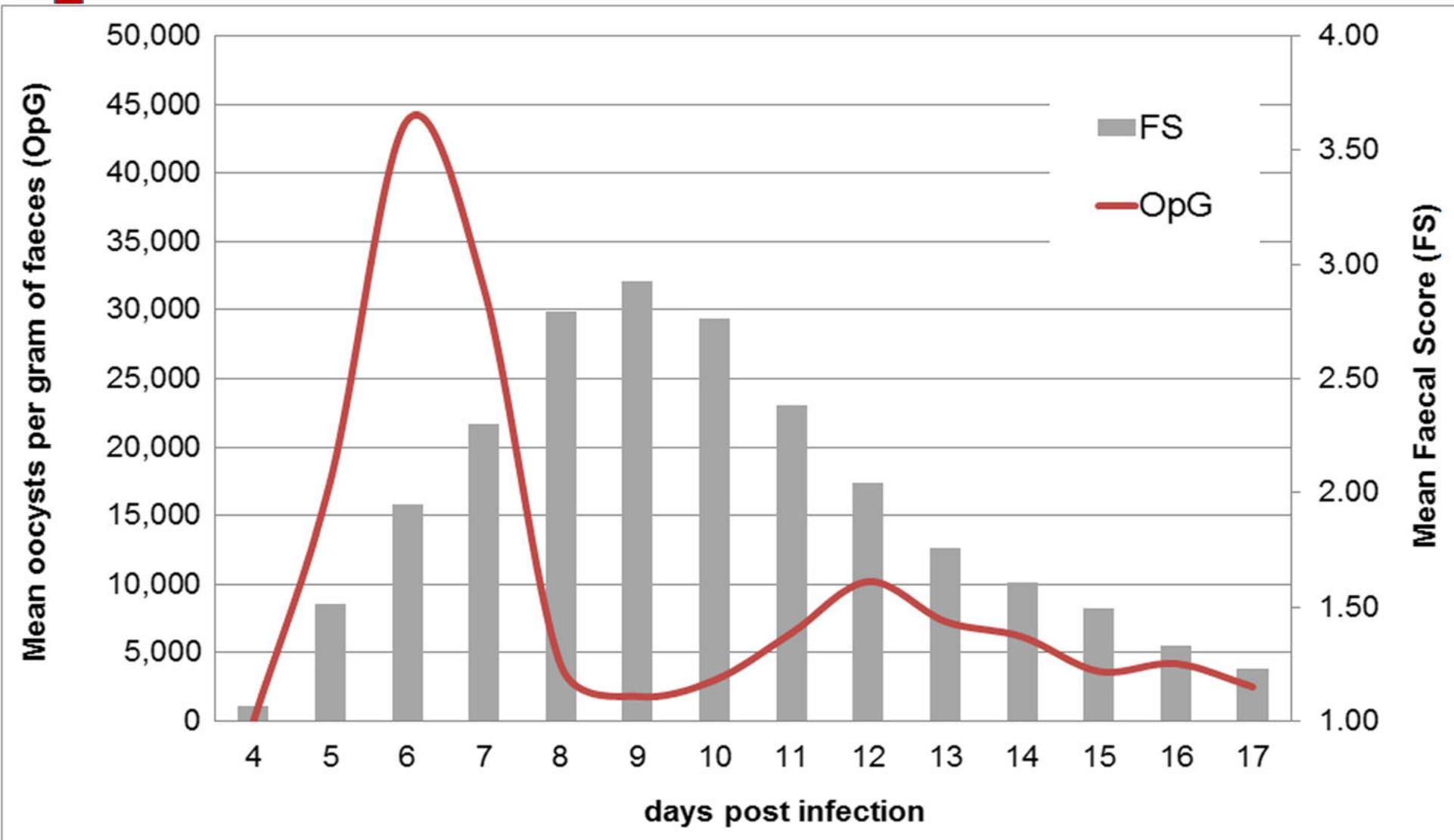
<i>Brachyspira spp.</i>





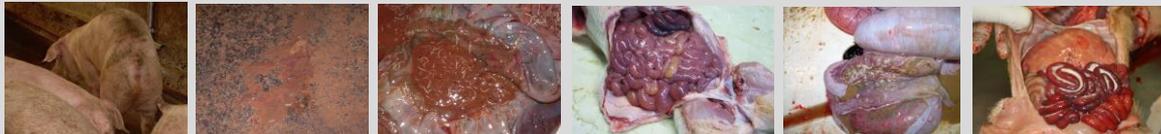
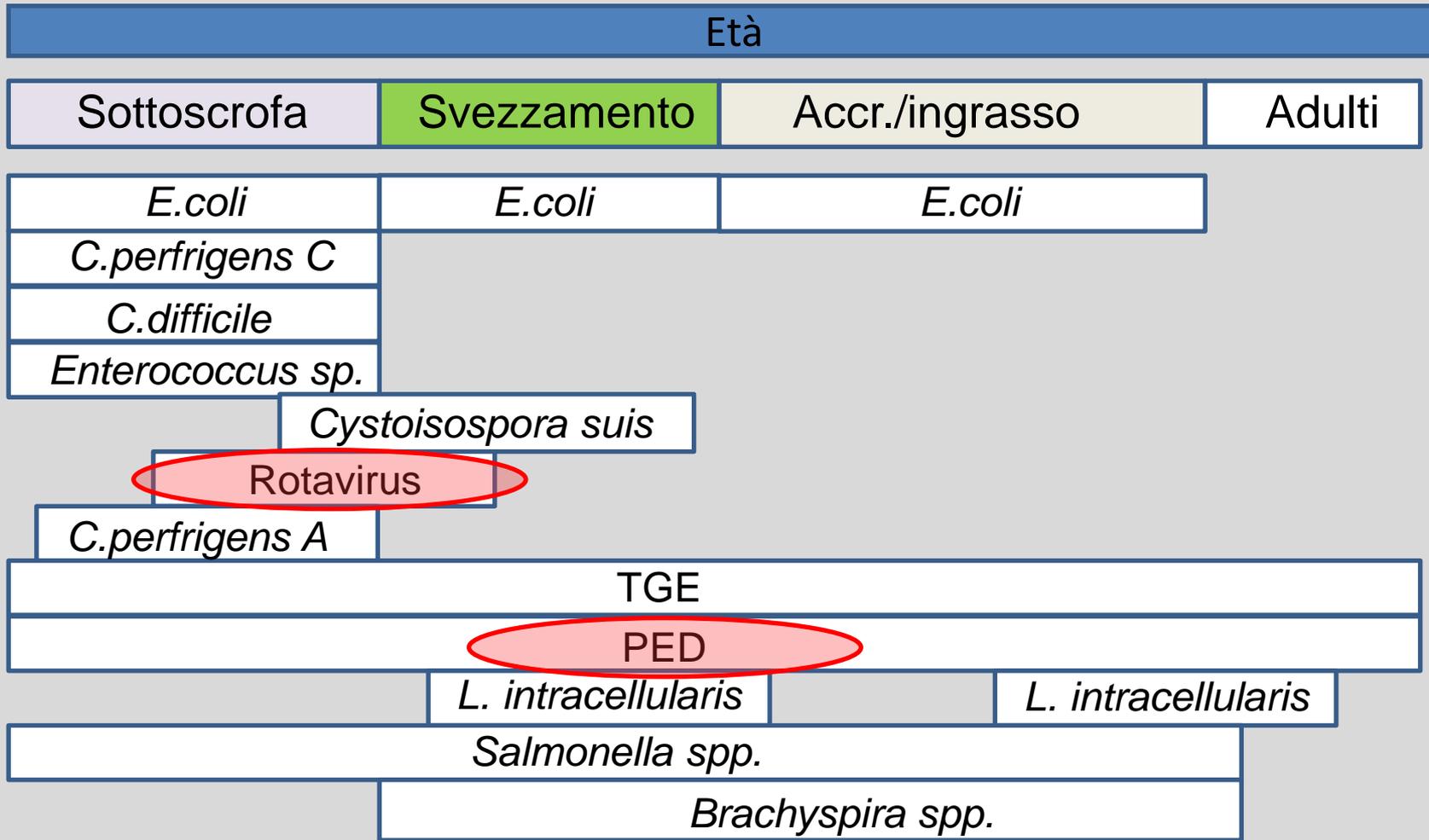
Detection of *Cystoisospora suis* in faeces of suckling piglets – when and how? A comparison of methods

Anja Joachim^{1*}, Bärbel Ruttkowski¹ and Daniel Sperling²



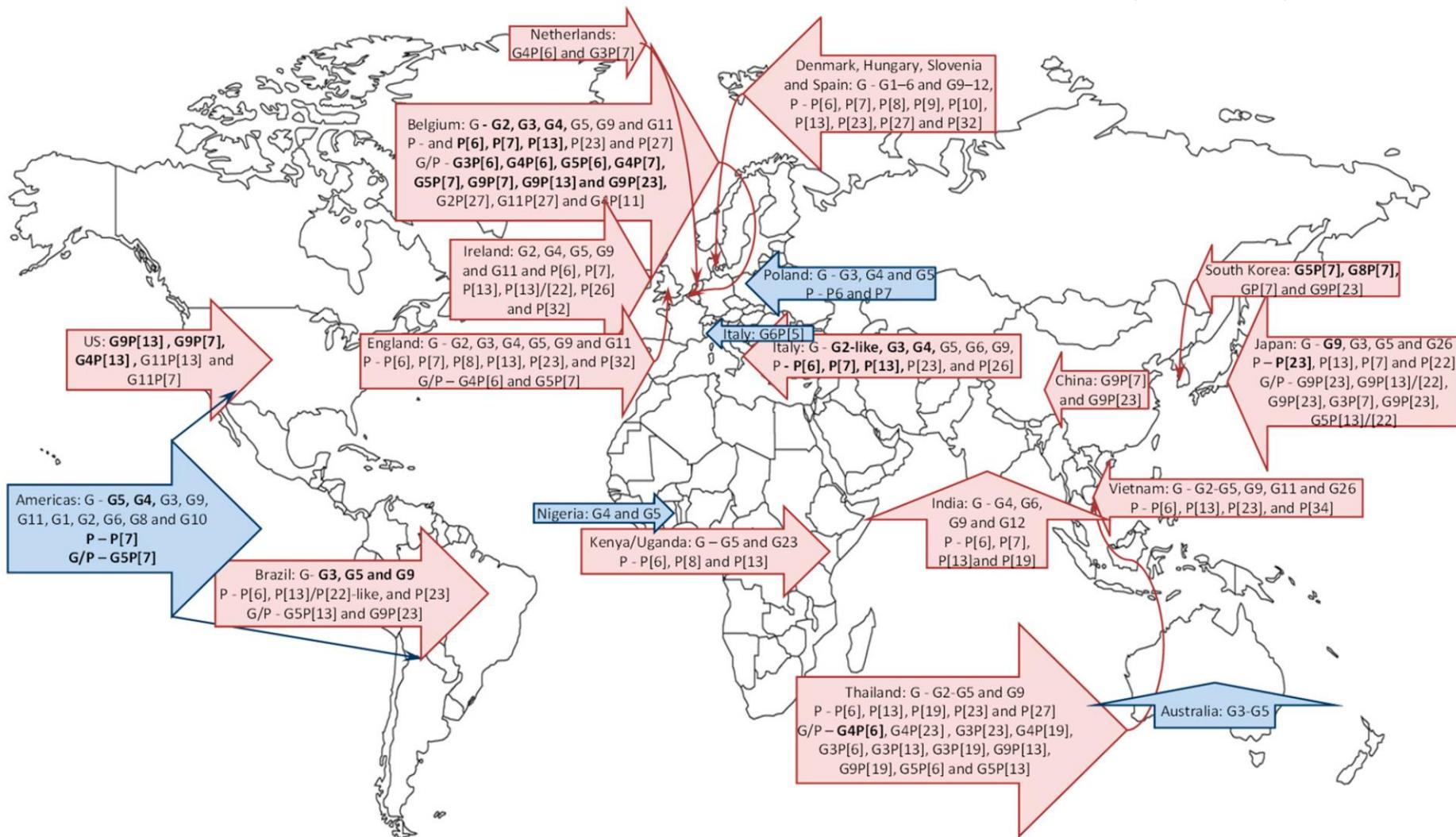


PRINCIPALI MALATTIE ENTERICHE DEL SUINO





ROTAVIRUS A





ROTAVIRUS C



Review

Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies

Anastasia N. Vlasova ^{1,*}, Joshua O. Amimo ^{2,3} and Linda J. Saif ^{1,*}



Available online at www.sciencedirect.com



VIROLOGY



ELSEVIER

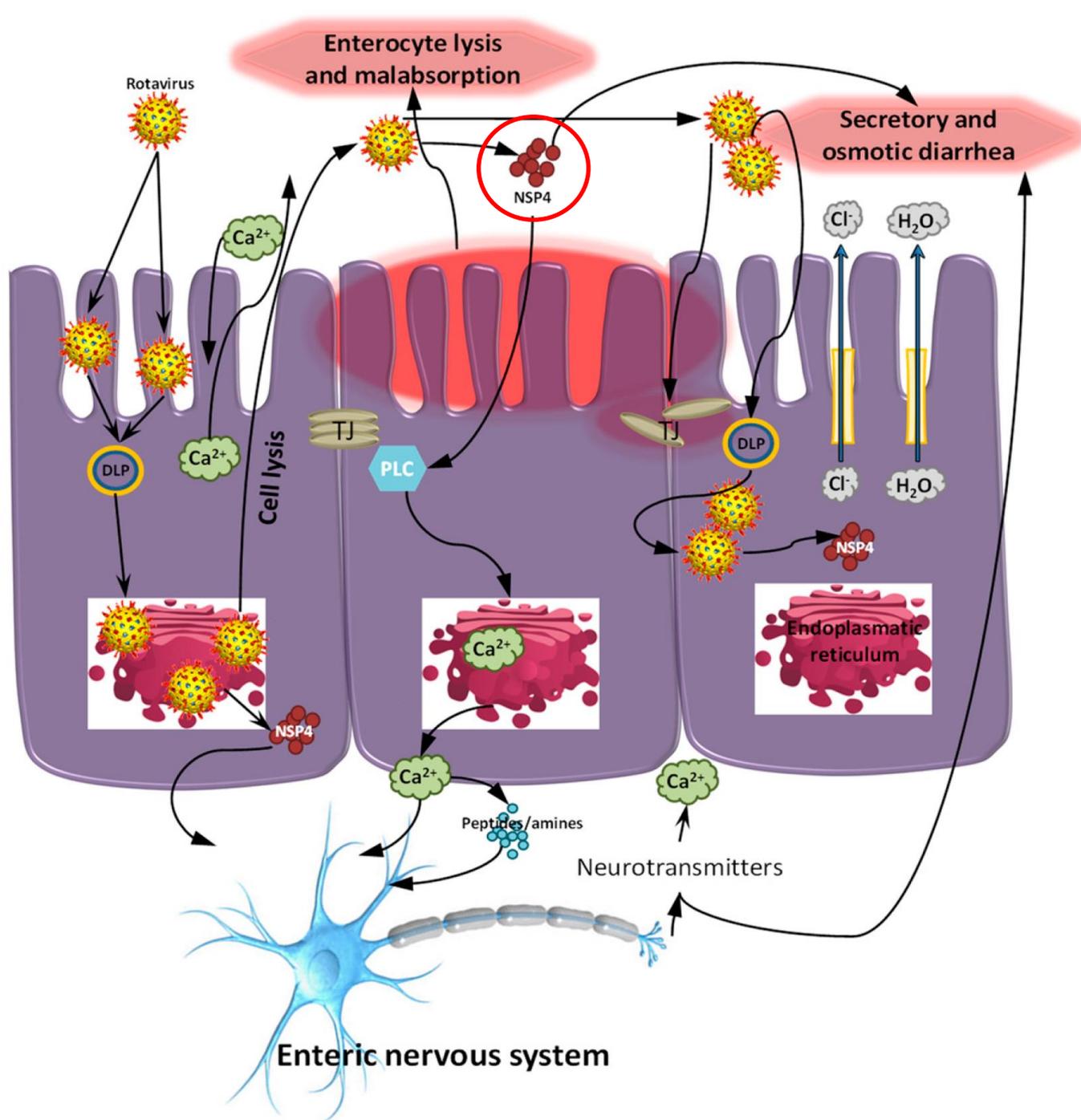
Virology 367 (2007) 358–366

www.elsevier.com/locate/yviro

Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses

Vito Martella ^{a,*}, Krisztián Bányai ^b, Eleonora Lorusso ^a, Nicola Decaro ^a, Anna Bellacicco ^a, Costantina Desario ^a, Marialaura Corrente ^a, Grazia Greco ^a, Paschalina Moschidou ^a, Maria Tempesta ^a, Serenella Arista ^c, Max Ciarlet ^d, Antonio Lavazza ^e, Canio Buonavoglia ^a







CRITERI DIAGNOSTICI: Rotavirus



CLINICA

Età:

1-5 settimane

Diarrea:

Acquosa gialla-pH acido



NECROSCOPIA E
CAMPIONAMENTO

Organo target: Piccolo intestino

Conservazione: +4°C (-20°C per PCR)

Fissazione in formalina: istopatologia e IHC

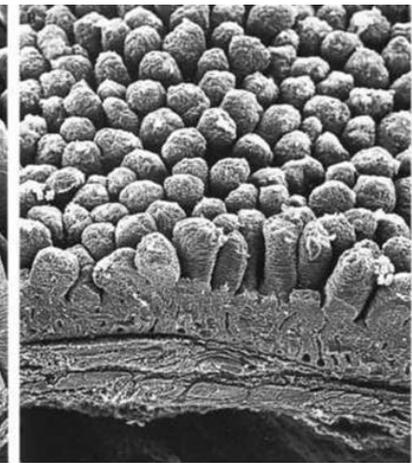
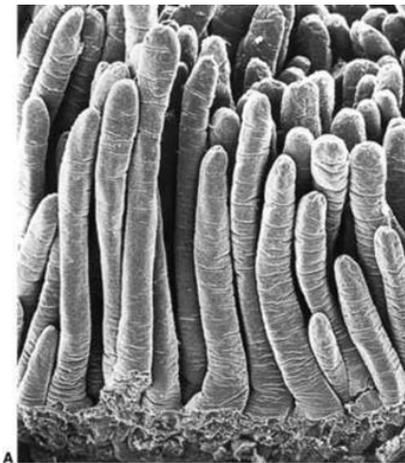
INDAGINI DI
LABORATORIO

PCR

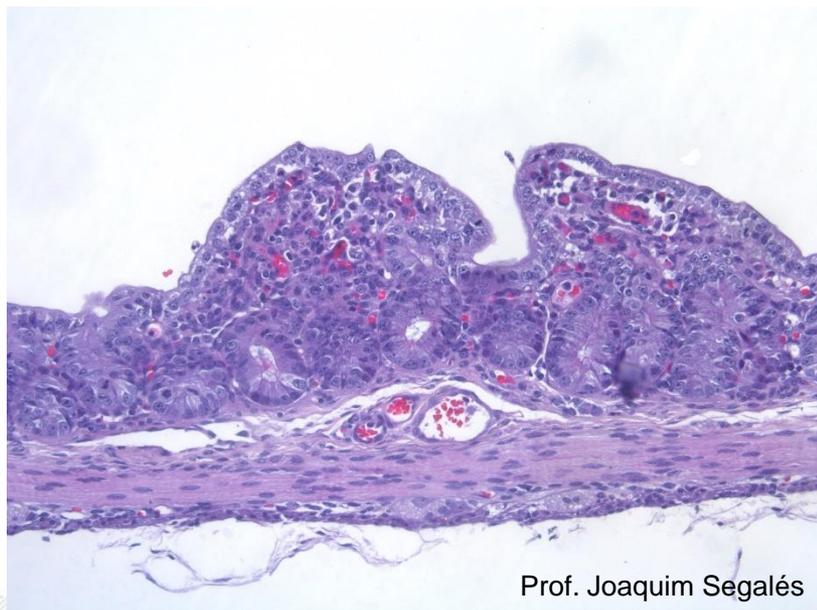
Istopatologia e IHC



ATROFIA DEI VILLI



<https://obgynkey.com/infective-diarrhoea-and-inflammatory-bowel-disease/>



Prof. Joaquim Segalés



CRITERI DIAGNOSTICI: PEDV



CLINICA

Età:
tutte
Diarrea:
Acquosa gialla,
biancastra, grigia.

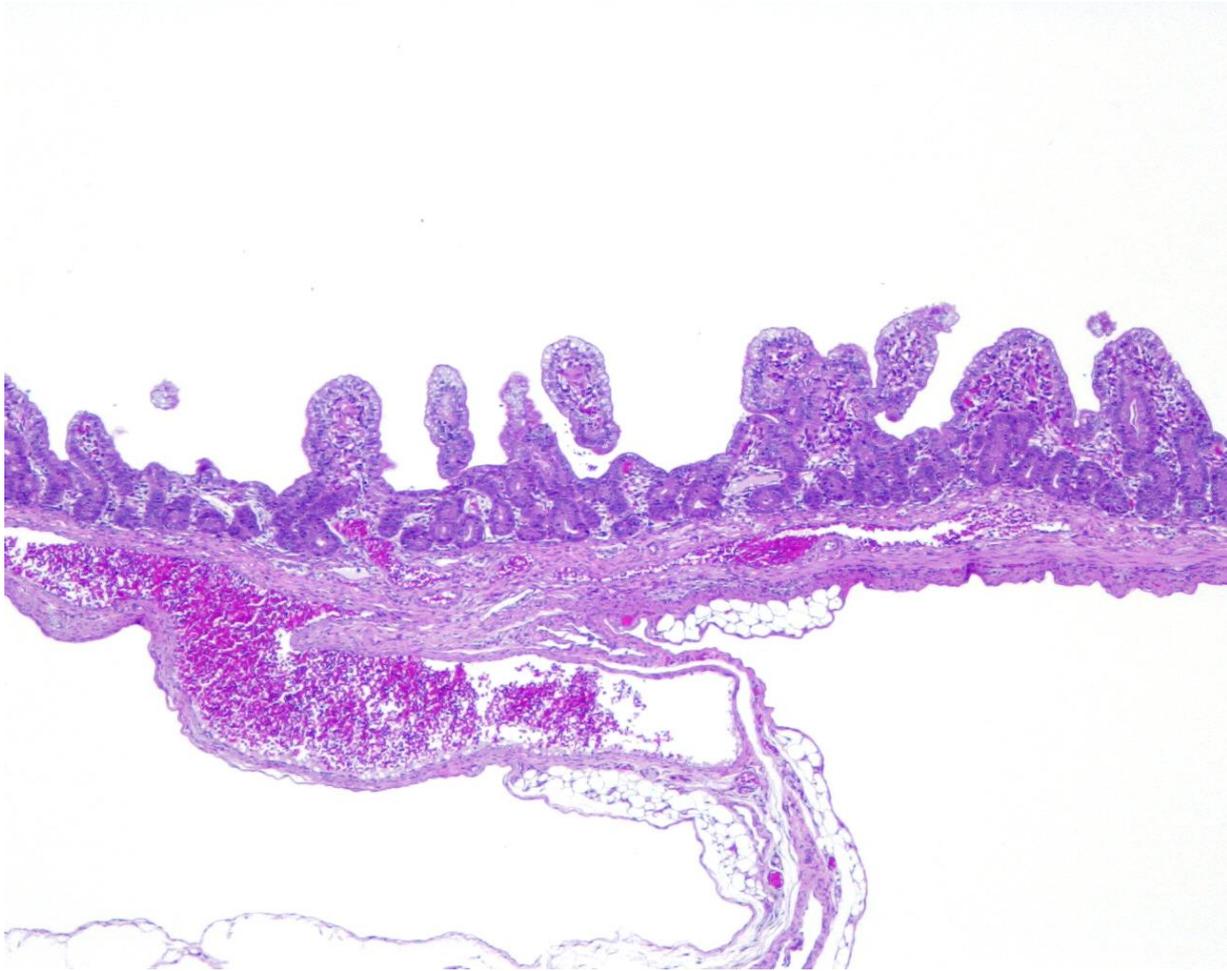


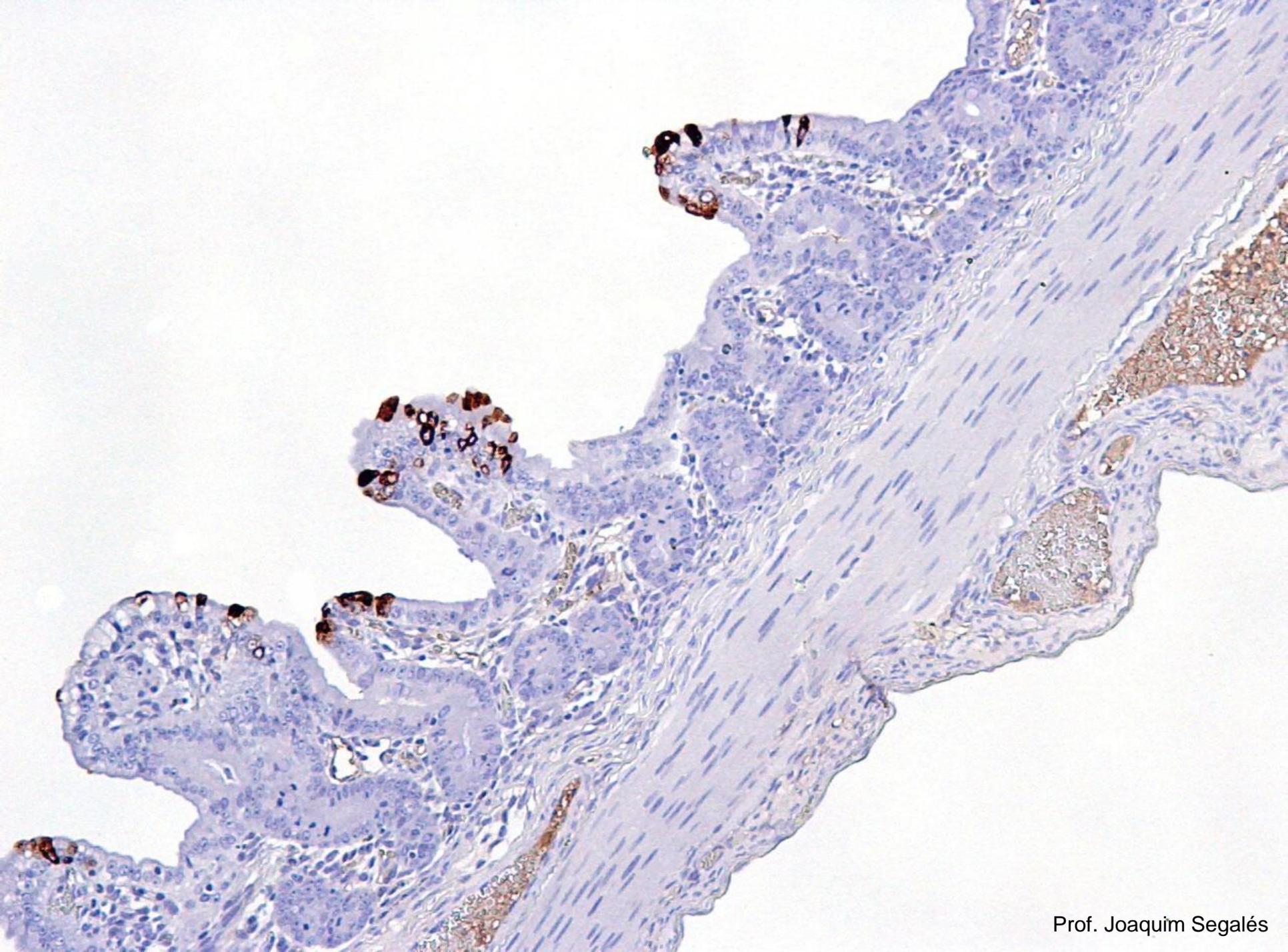
**NECROSCOPIA E
CAMPIONAMENTO**

Organo target: Piccolo intestino
Conservazione: +4°C (-20°C per PCR)
Fissazione in formalina: istopatologia e IHC

**INDAGINI DI
LABORATORIO**

PCR
Istopatologia
IHC







TAKE HOME MESSAGE



Grazie per l'attenzione

andrea.luppi@izsler.it