

Enteropatia proliferativa da *Lawsonia intracellularis* nel suino



GIULIA D'ANNUNZIO¹, ROBERTO BARDINI², FABIO OSTANELLO¹, GIUSEPPE SARLI^{1*}

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

² Trouw Nutrition Italia S.p.A.

RIASSUNTO

L'enteropatia proliferativa del suino (*proliferative enteropathy* - PE), denominata anche ileite, è causata da *Lawsonia intracellularis*, un batterio intracellulare obbligato. La PE è una patologia a trasmissione oro-fecale che si manifesta soprattutto nella fase di magronaggio ed è responsabile di consistenti perdite economiche negli allevamenti intensivi. I danni economici sono causati dalla riduzione dell'incremento ponderale e dell'indice di conversione dell'alimento e dall'aumento della mortalità e dei soggetti di scarto. La PE è endemica in numerosi Paesi con prevalenze di aziende ed animali infetti che, in Europa, superano il 90% e il 40%, rispettivamente. Nel suino, la patologia è caratterizzata da un ispessimento della mucosa intestinale dovuto alla proliferazione incontrollata delle cellule delle cripte intestinali accompagnata dall'inibizione, ad opera di *L. intracellularis*, della maturazione e della differenziazione delle cellule calciformi secretorie e delle cellule assorbenti. La conseguenza inevitabile è la riduzione dell'assorbimento dei nutrienti e la perdita di aminoacidi e proteine nel lume intestinale, con conseguente diarrea. La PE si manifesta con due forme cliniche principali: 1) la forma acuta (enteropatia proliferativa emorragica - PHE) che si osserva principalmente in animali dai 4 ai 12 mesi d'età, caratterizzata da una diarrea sanguinolenta e da elevata mortalità (fino al 50%) e, 2) la forma cronica (adenomatosi intestinale - PIA) che colpisce suini dalle 6 alle 20 settimane d'età, e il cui sintomo principale è rappresentato da una diarrea con feci pastose. Sono state descritte anche altre due forme cliniche a bassa incidenza: a) l'enterite necrotica (NE), espressione di una forma di enteropatia proliferativa cronica complicata da infezioni secondarie che esita in un'estesa necrosi coagulativa dell'epitelio intestinale e, b) l'ileite regionale (RI), risultante dalla guarigione delle lesioni dovute a NE e caratterizzata da deposizione di tessuto di granulazione e ispessimento della tonaca muscolare. La diagnosi indiretta, che viene generalmente eseguita utilizzando un test ELISA, consente di valutare l'eventuale esposizione dei suini a *L. intracellularis*, mentre la diagnosi diretta (realizzata impiegando test biomolecolari qualitativi: PCR o quantitativi: qPCR, immunostochimica - IHC) permette di valutare se l'infezione è in atto. Analogamente a quanto accade per altre forme patologiche del suino, la semplice messa in evidenza di *L. intracellularis* nelle feci non rappresenta un criterio diagnostico valido nei confronti di PE. La corretta procedura diagnostica prevede la quantificazione del numero di microrganismi/grammo di feci e la messa in evidenza di *L. intracellularis* all'interno delle lesioni intestinali. La profilassi e il controllo si basano sull'applicazione di rigide misure di lavaggio e disinfezione che consentono di ridurre la contaminazione ambientale tra un ciclo produttivo e l'altro e l'applicazione di misure di biosicurezza interna. Particolare attenzione va riservata all'alimentazione, che dovrebbe garantire l'equilibrio della microflora intestinale tramite un corretto rapporto tra proteina altamente digeribile e frazione di fibra, con il supporto di integratori probiotici e prebiotici. In una logica di uso consapevole del farmaco, la somministrazione di massa di antibiotici durante la fase critica del magronaggio dovrebbe essere limitata ai soli gruppi con sintomatologia clinica, implementando invece la profilassi vaccinale.

PAROLE CHIAVE

Lawsonia intracellularis; enteropatia proliferativa; suino.

INTRODUZIONE

Le patologie enteriche dei suini, in particolare quelle che si manifestano durante lo svezzamento, sono molto comuni e spesso di natura infettiva. In genere, i virus svolgono un ruolo patogeno principale negli animali giovani, mentre in quelli in accrescimento alcuni batteri e protozoi sono spesso responsabili di diarrea, con conseguente riduzione dell'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG)¹.

L'enteropatia proliferativa del suino (*proliferative enteropathy* - PE), è una patologia tipica della fase di magronaggio, responsabile di consistenti perdite economiche negli allevamenti intensivi dovute alla riduzione dell'IPMG, dell'indice di conversione dell'alimento e all'aumento della mortalità e dei soggetti di scarto². Stime realizzate in diversi Paesi indicano che la PE può causare una riduzione dell'1,2% degli utili dell'allevamento e perdite variabili da 1,2 a 2,5 € per ogni suino svezzato e da 2,2 a 7,8 € per ogni suino da ingrasso con sintomatologia².

Il microrganismo responsabile, *Lawsonia intracellularis*, è un batterio intracellulare obbligato, Gram-negativo, non sporigeno, microaerofilo³, localizzato, *in vivo*, nel citoplasma apicale del-

Corresponding Author:

Giuseppe Sarli (giuseppe.sarli@unibo.it)

le cellule epiteliali delle cripte intestinali.

Nel suino, la patologia è caratterizzata da un ispessimento della mucosa intestinale causato dalla proliferazione incontrollata delle cellule delle cripte intestinali accompagnata all'inibizione, ad opera di *L. intracellularis*, della maturazione e della differenziazione delle cellule caliciformi secretorie e delle cellule assorbenti. La conseguenza inevitabile è la riduzione dell'assorbimento dei nutrienti e la perdita di aminoacidi e proteine nel lume intestinale, condizioni prodromiche allo sviluppo di diarrea⁴.

Le conoscenze sulla patogenesi della PE sono limitate sia dalla difficoltà a coltivare *in vitro*, su substrati cellulari, colture pure di *L. intracellularis*⁵, sia dalla mancanza di modelli *in vitro* in grado di riprodurre le lesioni proliferative⁶. Sebbene i focolai di PE vengano segnalati a livello globale, è stato stimato che meno di 25 isolati di *L. intracellularis* siano stati coltivati con successo e mantenuti *in vitro* in tutto il mondo. Di questi isolati, solo 15 sono stati saggiati per la loro sensibilità agli antimicrobici⁷.

In questa *review* vengono presentati gli aspetti principali dell'enteropatia proliferativa da *Lawsonia intracellularis* nel suino, compresi quelli recentemente riportati nel corso della 1st International conference on *Lawsonia intracellularis* - The Gordon Lawson Memorial Symposium (The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Edinburgh, UK, 26 e 27 settembre 2019) (Figura 1).

EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da *L. intracellularis* è diffusa nei suini domestici di tutto il mondo, con evidenza di forme cliniche soprattutto negli allevamenti intensivi⁸. In alcuni Paesi Europei (Germania, Danimarca, Spagna, Olanda e Regno Unito), la prevalenza di allevamenti infetti varia dal 6,7 al 93,7%, mentre la prevalenza intra-aziendale varia dallo 0,7 al 43,2%². Tuttavia, per la corretta interpretazione di questi dati occorre prendere in considerazione alcuni fattori quali l'età dei soggetti esaminati e la diversa sensibilità e specificità dei test diagnostici utilizzati nei diversi studi. Inoltre, la semplice dimostrazione della presenza di *L. intracellularis* nelle feci dei suini non indica necessariamente una condizione di malattia⁹. È stata dimostrata la positività sierologica anche nei suini selvatici^{10,11}, che potrebbero rappresentare un fattore di rischio per gli allevamenti suinicoli all'aperto¹².

L'infezione naturale o sperimentale da *L. intracellularis* e le lesioni intestinali proliferative sono sporadicamente riportate anche in numerose specie diverse dal suino (criceto, cavallo, ratto, coniglio, furetto, volpe, cane, pecora, cervo, ratiti e primati non umani), sebbene non sia chiaro il ruolo di questi animali nell'epidemiologia della patologia del suino. In particolare, forme di malattia simili a quelle osservate nel suino sono state ampiamente descritte nel criceto da laboratorio e nel pulcedro¹³. Nonostante l'alto grado di omologia genetica tra gli isolati di *L. intracellularis* provenienti da specie animali diverse¹⁴, Vannucci *et al.*¹⁵ segnalano una potenziale differenza negli isolati di *L. intracellularis* ottenuti da suino e cavallo. È stato ipotizzato che i diversi ceppi di *L. intracellularis* possano possedere una sorta di specie-specificità. Sampieri *et al.*¹⁶ hanno dimostrato che i conigli sono più recettivi agli isolati di origine equina rispetto alle varianti suine mentre i criceti, al contrario, sono risultati più sensibili alle varianti di origine suina ri-

spetto a quelle di origine equina. I diversi ceppi sono quindi fenotipicamente identici ma è possibile differenziarli geneticamente (sia quelli provenienti da specie diverse, sia all'interno della stessa specie), individuando i polimorfismi del DNA mediante la quantificazione del numero di ripetizioni in tandem (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTR)¹⁷ (Figura 1a).

La trasmissione di *L. intracellularis* è di tipo oro-fecale ed avviene per via diretta e indiretta attraverso il contatto con feci di animali infetti, o attraverso contatto intraspecifico¹⁸.

Sperimentalmente, la dose infettante è relativamente bassa (10⁸ microrganismi)⁹ mentre la quantità di *L. intracellularis* eliminata può superare il valore di 10⁶ microrganismi/grammo di feci¹⁹.

Sperimentalmente è stato dimostrato che i suini si possono infettare anche attraverso il contatto con feci di topi infetti facendo ipotizzare che questi animali possano rivestire un ruolo importante nell'epidemiologia di *L. intracellularis* negli allevamenti suinicoli²⁰ (Figura 1b).

L'eliminazione fecale inizia circa una settimana post-infezione (p.i.), raggiunge il picco a 3 settimane e permane, in molti soggetti, per 4 settimane. In alcuni animali è stato osservato che l'eliminazione fecale si protrae in maniera intermittente fino a 12 settimane dimostrando quindi che *L. intracellularis* è in grado di colonizzazione a lungo termine l'ospite²¹ (Figura 1c). Questo aspetto è di particolare importanza considerando che nelle infezioni subcliniche gli animali clinicamente sani possono eliminare per lungo tempo il microrganismo nell'ambiente, condizionandone la persistenza in allevamento, anche a fronte di una resistenza ambientale di *L. intracellularis* di circa 2 settimane a 5-15°C. Gli animali con infezione subclinica presentano comunque una scarsa massa corporea in conseguenza della riduzione dell'IPMG²².

Negli allevamenti, la malattia si può manifestare in forme diverse in funzione del management aziendale, della dose infettante e del livello immunitario degli animali. Negli allevamenti a flusso continuo, l'infezione di solito si verifica poche settimane dopo lo svezzamento, presumibilmente in coincidenza con il declino dell'immunità passiva. La presenza di immunità materna giustificerebbe anche la mancata trasmissione di *L. intracellularis* in sala parto²³.

Questa dinamica temporale di infezione può essere ritardata dalla somministrazione di antimicrobici nelle prime settimane dopo lo svezzamento. In questo caso, la malattia compare nelle fasi di accrescimento e ingrasso. Negli allevamenti multisito, dove si applica la stretta separazione dei gruppi di suini (all-in/all-out, AIAO), l'infezione da *L. intracellularis* può comparire nei suini in accrescimento fino all'età di 14-20 settimane²⁴.

PATOGENESI

I fattori di virulenza responsabili dell'ingresso di *L. intracellularis* negli enterociti non sono stati ancora chiaramente individuati. Tuttavia, prove sperimentali *in vitro* hanno dimostrato che il processo di internalizzazione del batterio prevede una sua stretta adesione alla superficie cellulare, seguita dall'ingresso attraverso vacuoli prodotti dalla invaginazione della membrana cellulare e dal rilascio del patogeno nel citoplasma delle cellule²⁵.

Lawsonia intracellularis è in grado di infettare sia gli entero-

citi maturi sia le cellule epiteliali immature delle cripte intestinali: a 12 ore dall'infezione sperimentale per via orale, il patogeno è già presente nel citoplasma degli enterociti maturi, all'apice dei villi del piccolo intestino. Da 5 a 28 giorni p.i., *L. intracellularis* è presente nel citoplasma di cellule poco differenziate delle cripte intestinali, causando un'infezione persistente. A questo stadio dell'infezione, le cellule epiteliali delle cripte continuano a proliferare ma non raggiungono la maturazione, dando così luogo alla proliferazione adenomatosa caratteristica della PE²⁴.

Nel citoplasma delle cellule, *L. intracellularis* è associata a ribosomi liberi e mitocondri e, tramite il meccanismo conosciuto come "parassitismo energetico", sfrutta il pool energetico dell'ospite attraverso lo scambio di ADP batterico con ATP dell'ospite⁶. Nonostante il continuo trasporto d'ossigeno attraverso le membrane mitocondriali, *L. intracellularis* riesce a sopravvivere all'interno della cellula grazie ad un meccanismo di protezione dallo stress ossidativo che coinvolge l'enzima superossido dismutasi Cu-Zn (sodC) e la diossigenasi, resistendo ai metaboliti dello scoppio respiratorio^{15,26}.

La replicazione intracellulare di *L. intracellularis* è direttamente associata alla proliferazione degli enterociti²⁷, ma non sono ancora del tutto chiari i meccanismi mediante i quali *L. intracellularis* è in grado di determinare tale proliferazione. Grazie alla caratterizzazione del profilo di espressione genica degli enterociti infetti è stato osservato che le cellule proliferanti hanno una significativa attivazione della trascrizione del DNA, della biosintesi proteica e dei geni Rho che agiscono sulla fase G₁ del ciclo cellulare¹⁵. L'attivazione di questo meccanismo è già conosciuta nell'oncogenesi e nella promozione della proliferazione cellulare (Figura 1d). Considerando che alcune cicloduline batteriche possono attivare patologicamente le proteine Rho²⁸, è stato ipotizzato che possa esserci un meccanismo simile anche alla base dell'induzione della proliferazione da parte di *L. intracellularis*⁶. Durante l'infezione è stata osservata la sotto-espressione di numerosi geni i cui prodotti sono espressi nelle membrane apicali degli enterociti e sono coinvolti nell'assorbimento di nutrienti in quanto trasportatori di membrana responsabili dell'assorbimento di carboidrati, aminoacidi, lipidi e vitamina B12. L'infezione intracellulare influenza inoltre la secrezione di elettroliti, diminuendo l'espressione del gene del canale del cloruro (CLCA1). Questa riduzione dell'assorbimento di nutrienti, accompagnata dalla secrezione di elettroliti, è alla base del malassorbimento e della patogenesi della diarrea. *L. intracellularis* è quindi direttamente responsabile della mancata differenziazione degli enterociti immaturi oltre che della loro proliferazione che è probabilmente indotta dalla mancata regolazione della fase G₁ del ciclo cellulare dell'ospite¹⁵.

Con il progredire dell'infezione, *L. intracellularis* può essere osservata all'interno dei macrofagi situati nella lamina propria, anche dopo la sua clearance dalle cellule epiteliali dell'intestino (Figura 2). È quindi probabile che i macrofagi abbiano un ruolo nella diffusione dell'infezione¹.

La risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata è evidenziabile a partire da 2 settimane p.i. e, in alcuni animali, persiste fino a circa 3 mesi p.i. Il picco sierico di IgG si osserva alla terza settimana p.i. a cui fa seguito una graduale riduzione. IgA specifiche sono evidenziabili a livello intestinale a partire dalla terza settimana p.i.²⁴. È stato dimostrato che suini che hanno superato l'infezione sperimentale risultano protetti nei confronti della colonizzazione intestinale e della sintomatologia

clinica se esposti nuovamente al patogeno. La risposta immunitaria specifica nei confronti di *L. intracellularis* è quindi protettiva (per almeno 10 settimane) nei confronti di un'eventuale re-infezione²⁹. La progenie di scrofe gravemente interessate dalla patologia non è completamente protetta nei confronti della PE²³.

Alcune osservazioni sperimentali indicano inoltre che *L. intracellularis* è in grado di modulare la risposta immunitaria, consentendo l'infezione persistente delle cellule epiteliali delle cripte. Studi *in vivo* hanno costantemente dimostrato una sotto-regolazione dei geni correlati alla risposta immunitaria. È stata inoltre osservata, nei suini infetti, una riduzione del numero di linfociti T e B²⁴.

FORME CLINICHE

L'enteropatia proliferativa del suino si può presentare sia in forma clinica sia in forma subclinica (Figura 3).

Le forme cliniche principali sono rappresentate da una forma acuta (enteropatia proliferativa emorragica, *proliferative hemorrhagic enteropathy* - PHE) che si manifesta soprattutto in animali di 4-12 mesi d'età ed è caratterizzata da una diarrea sanguinolenta e da elevata mortalità (fino al 50%) e da una forma cronica (adenomatosi intestinale, *porcine intestinal adenomatosis* - PIA) che colpisce suini dalle 6 alle 20 settimane d'età, e il cui sintomo principale è rappresentato da una diarrea con feci pastose.

Sono state descritte anche altre due forme cliniche a bassa incidenza: l'enterite necrotica (*necrotic enteritis* - NE), espressione di una forma di enteropatia proliferativa cronica complicata da infezioni secondarie che esita in un'estesa necrosi coagulativa dell'epitelio intestinale e l'ileite regionale (*regional ileitis* - RI), risultante dalla guarigione delle lesioni dovute a NE e caratterizzata da deposizione di tessuto di granulazione e ispessimento della tonaca muscolare^{24,30}.

Clinicamente, la PHE è caratterizzata dalla morte improvvisa dei soggetti interessati, preceduta da diarrea emorragica e anemia. La PIA può essere invece di più difficile identificazione soprattutto quando la diarrea è assente o si manifesta solo nei soggetti in cui le lesioni intestinali sono più gravi.

Nelle forme croniche clinicamente evidenti, i suini presentano lieve o moderata diarrea da densa ad acquosa e di colore verdognolo, associata ad anoressia di grado variabile e ridotto accrescimento, nonostante il consumo di alimento sia nella norma²⁴.

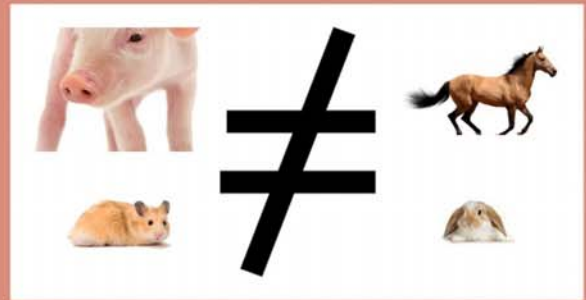
La forma subclinica di PE è quella più comune nei suini in accrescimento, anche se di difficile riconoscimento in quanto gli unici sintomi sono rappresentati dalla riduzione dell'IPMG e dalla difformità di accrescimento all'interno del gruppo^{24,31} (Figura 1e).

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

La lesione macroscopica tipica della PE è l'ispessimento della mucosa intestinale che si verifica a causa della proliferazione delle cellule delle cripte intestinali. Nei suini in accrescimento affetti dalla forma cronica (PIA), le lesioni si osservano principalmente a carico della porzione terminale dell'ileo, lungo i 10 cm a monte della valvola ileo-ciecale, e a livello di cieco (Figura 1f). Nei casi gravi le lesioni possono coinvolgere anche il

Figura 1 - Aspetti principali dell'enteropatia proliferativa da *Lawsonia intracellularis* nel suino enfatizzati nel corso della 1st International conference on *Lawsonia intracellularis* - The Gordon Lawson Memorial Symposium (The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Edinburgh, UK, 26 e 27 settembre 2019).

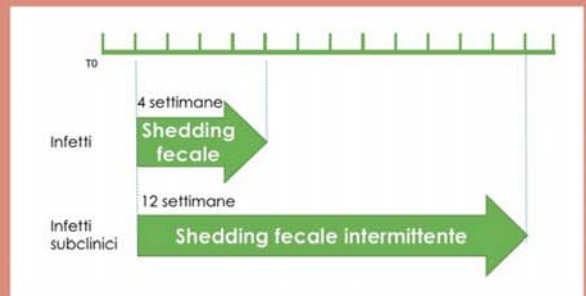
a. I diversi ceppi di *LI* sono specie-specifici e fenotipicamente identici ma è possibile differenziarli genotipicamente mediante VNTR



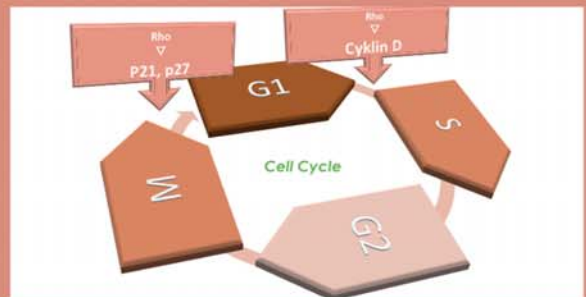
b. Possibile infezione mediante contatto con feci di topi infetti



c. Eliminazione fecale a partire da 1 settimana PI fino a 4 settimane; possibile eliminazione intermittente fino a 12 settimane PI da parte di soggetti subclinici



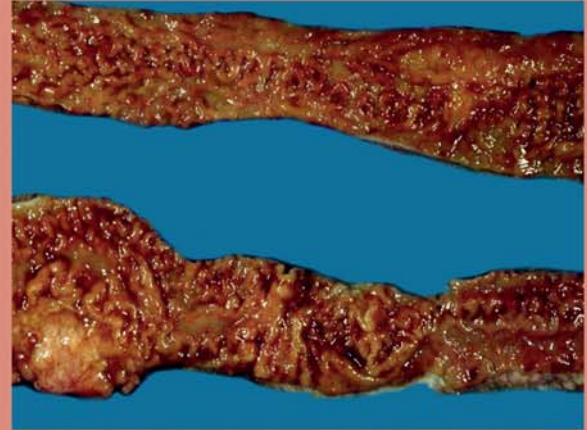
d. Significativa attivazione negli enterociti infetti della trascrizione del DNA, della biosintesi proteica e dei geni Rho che agiscono sul ciclo cellulare



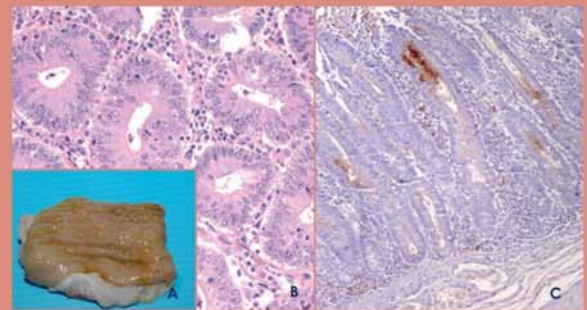
e. Le forme acuta (PHE) e cronica (PIA) sono contraddistinte da sintomatologica caratteristica; nelle forme subcliniche di PE l'unico segno rappresentativo è la riduzione dell'IPMG e la difformità di accrescimento all'interno del gruppo



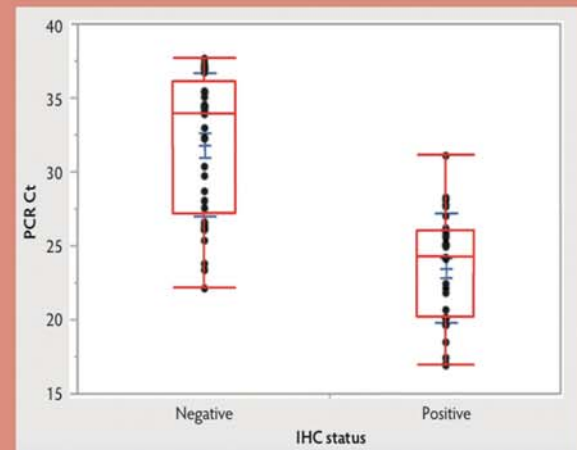
f. Nei suini in accrescimento affetti da PIA la mucosa appare ispessita e sollevata in pliche e le lesioni si osservano principalmente a carico della porzione terminale dell'ileo lungo i 10 cm a monte della valvola ileo-ciecale, e a livello di cieco (foto da Marcato, 2015⁴⁸)



g. Il sospetto clinico di PE può essere confermato osservando le tipiche lesioni macroscopiche e microscopiche (A e B). Per la rilevazione di LI in campioni istologici, l'immunoistochimica (IHC) è la tecnica a maggiore sensibilità e specificità. Per questo motivo l'IHC è il gold standard per la diagnosi di PE (C)



h. Considerando l'elevata sensibilità della RT-PCR e la distribuzione segmentale delle lesioni di PE, i risultati diagnostici devono essere interpretati in maniera critica e opportunamente integrati tra loro. Bassi valori di Ct (<20) di una PCR semi-quantitativa (corrispondenti ad una quantità di LI >10⁴/g feci) sono correlati ad alti valori di score all'esame IHC di campioni di tessuto intestinale



i. Individuando l'arco di tempo in cui si sviluppa l'infezione all'interno dell'allevamento è possibile stabilire il momento in cui iniziare l'eventuale somministrazione di antibiotici che dovrà essere realizzata circa tre settimane prima del picco di sieroconversione



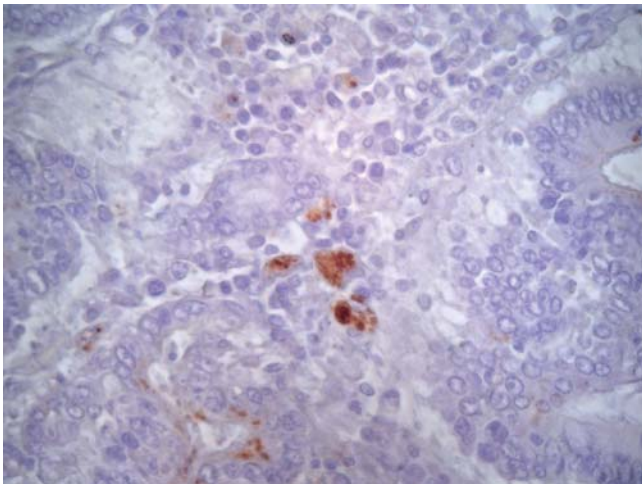


Figura 2 - Positività immunoistochimica per *L. intracellularis* nel citoplasma dei macrofagi a livello di lamina propria della mucosa intestinale.

digiuno e il colon spirale. Indipendentemente dalla localizzazione, la mucosa si presenta ispessita e arricciata in pieghe longitudinali e trasversali, assumendo il tipico aspetto “cerebroide”. Nei casi complicati da infezioni secondarie che esitano in forme di enterite necrotica (NE), all’ispessimento della mucosa si associa la presenza di membrane fibrino-necrotiche sulla superficie della mucosa intestinale che possono staccarsi ed essere rinvenute libere nell’intestino o nelle feci diarroiche. Nella forma acuta emorragica (PHE), si osservano dilatazione intestinale e ispessimento della parete causato dalla presenza di edema e dalla proliferazione della mucosa. Il lume dell’ileo può contenere uno o più coaguli frammisti a detriti fibrino-necrotici; nel retto si possono osservare feci dall’aspetto catramoso contenenti sangue misto ad alimento indigerito²⁴.

Le lesioni istologiche comuni a tutte le forme di PE sono la proliferazione adenomatosa dell’epitelio delle cripte del piccolo intestino e delle ghiandole nella mucosa del grosso intestino. Le cripte intestinali si presentano iperplastiche, con epitelio costituito da enterociti immaturi e cellule disposte su più piani a formare un epitelio pseudostratificato al posto di quello tipico monostratificato colonnare (Figura 4). Le cellule calciformi possono essere rare o del tutto assenti³². Tramite opportune colorazioni istologiche è possibile rilevare la presenza di *L. intracellularis* a livello intracellulare.

DIAGNOSI

La diagnosi diretta di laboratorio, che consente di valutare la presenza di *L. intracellularis* nelle feci o in campioni di tessuti intestinale, può essere eseguita utilizzando tecniche di (*Polymerase Chain Reaction*) PCR qualitativa, PCR quantitativa (qPCR), PCR multiplex o l’immunoistochimica (IHC). La ricerca di anticorpi specifici nel siero o nei fluidi orali, che fornisce informazioni relative all’esposizione dei suini al patogeno, viene eseguita utilizzando tecniche immuno-enzimatiche (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA), l’immunofluorescenza (*immunofluorescence assay*; IFA), o l’immunoperoxidasi (*immunoperoxidase monolayer assay*; IPMA)³¹. La conferma del sospetto clinico di PE può essere ottenuta mediante l’osservazione, durante l’esame *post-mortem*, delle lesioni macroscopiche tipiche della patologia, associata alla rilevazione di quelle microscopiche. L’IHC, mediante la quale gli antigeni di *L. intracellularis* vengono messi in evidenza all’interno delle lesioni grazie all’impiego di anticorpi monoclonali specifici¹⁸ (Figura 5), è la tecnica che garantisce la maggiore sensibilità e specificità. Per questo motivo, l’IHC rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di PE (Figura 1g).

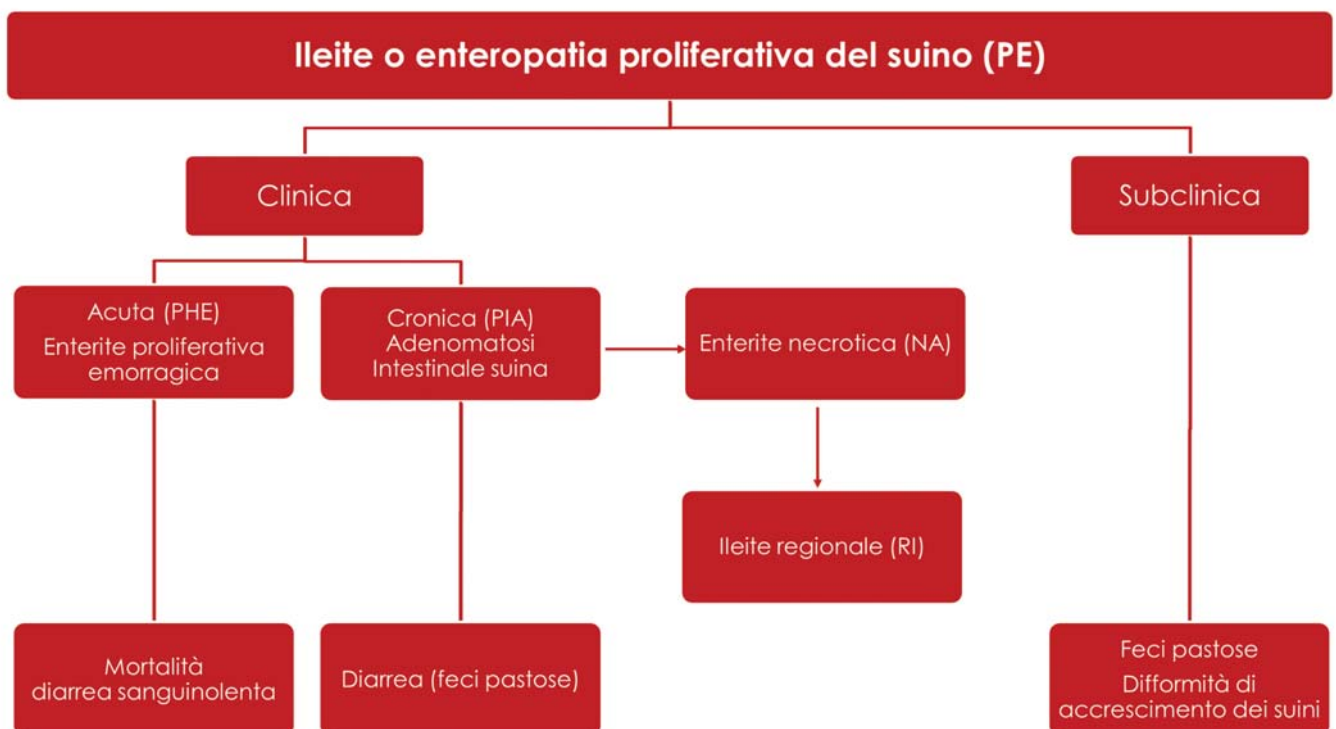


Figura 3 - Classificazione delle forme cliniche e subcliniche di enterite proliferativa del suino (PE)

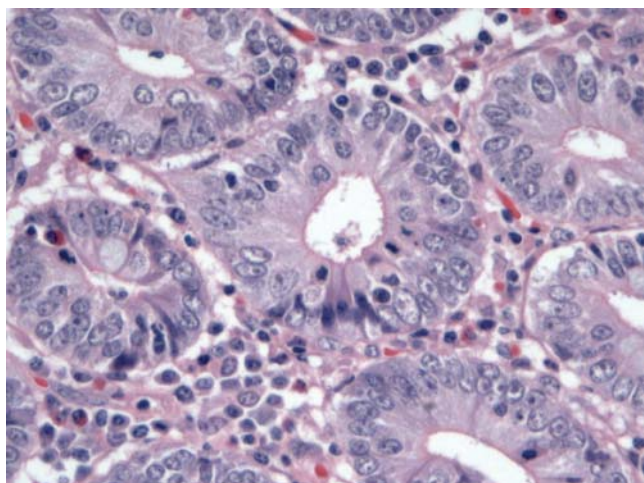


Figura 4 - Cripte iperplastiche del piccolo intestino: cellule epiteliali delle cripte disposte su più piani a formare un epitelio pseudo-stratificato (ematossilina - eosina, 40x).

Nelle aziende in cui l'infezione è endemica, i soggetti con forma subclinica di PE possono essere individuati rilevando la presenza intermittente di *L. intracellularis* nelle feci di animali con ridotto accrescimento. L'individuazione del DNA batterico nelle feci indica una condizione di infezione attiva ma è necessaria un'indagine diagnostica più completa per stabilire il reale stato di salute della mandria o l'eventuale associazione di *L. intracellularis* con altre malattie enteriche che possono mimare la presentazione clinica di PE quali colite da *Brachispira spp.*, salmonellosi, colibacillosi, gastroenterite trasmissibile (TGE) e la diarrea causata dal Circovirus suino tipo 2 (PCV2)²⁴. La sensibilità analitica delle tecniche biomolecolari è aumentata considerevolmente negli ultimi anni soprattutto grazie alla messa a punto di saggi Real-Time PCR, che sono in grado di fornire un esito positivo anche con basse quantità di *L. intracellularis* (100 microrganismi/grammo di feci). A causa di questa elevata sensibilità analitica, la semplice dimostrazione della presenza di *L. intracellularis* nelle feci può non essere indicativa della presenza in allevamento di problematiche economicamente significative causate da PE. Allo stesso modo, considerando la distribuzione segmentale delle lesioni da PE, occorre interpretare con cautela un risultato negativo all'IHC. È preferibile, quando possibile, esaminare con l'IHC un numero maggiore di segmenti intestinali per dimostrare in maniera più efficiente l'infezione da *L. intracellularis* nel contesto di lesioni tipiche localizzate²⁴ (Figura 1g).

La gravità dei sintomi è proporzionale al livello di escrezione di *L. intracellularis* nelle feci³³ e l'aumento della concentrazione del patogeno è significativamente associato alla riduzione dell'IPMG mentre l'escrezione di basse quantità di *L. intracellularis* non sembra avere alcun effetto sull'accrescimento. L'aumento di un logaritmo della quantità di *L. intracellularis* eliminata con le feci raddoppia la probabilità che un suino presenti un basso tasso di accrescimento¹⁹. In particolare, quando vengono rilevati oltre 10⁶ patogeni/g di feci, ciò costituisce un fattore di rischio significativo nei confronti di un incremento ponderale non soddisfacente¹⁹. I risultati dei test qPCR permettono quindi di mettere in relazione la quantità di *L. intracellularis* presente nelle feci con le conseguenze economiche della malattia (riduzione dell'IPMG)¹⁹, o con la presenza di più gravi lesioni macroscopiche e istologiche³⁴. Ad esempio, Burrough et al.³⁵ utilizzando una PCR semi-quantitativa hanno definito che valori di *threshold cycle* (Ct) <20 (corrispondenti a

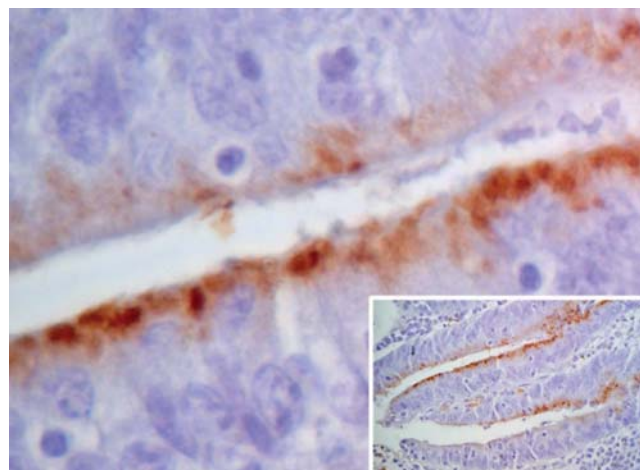


Figura 5 - Positività immunoistochimica per *L. intracellularis* nella porzione apicale delle cellule delle cripte intestinali (63x; inserto: 40x).

una quantità di *L. intracellularis* superiore a 10⁴/g di feci) sono correlati ad alti valori di score all'esame IHC di campioni di tessuto intestinale (Figura 1h). Quando i valori di Ct sono compresi tra 20 e 30, il risultato deve essere interpretato prendendo in considerazione l'anamnesi clinica per escludere che altri agenti eziologici siano responsabili dei segni clinici presenti nell'animale esaminato. Per valori di Ct >30, nel 95% degli animali esaminati il risultato dell'IHC era negativo, suggerendo la scarsa probabilità che *L. intracellularis* fosse la causa della diarrea osservata nell'animale esaminato.

La positività alla PCR di campioni fecali di animali clinicamente sani sottolinea l'importanza delle forme subcliniche di PE. Questa osservazione deve essere presa in considerazione nella definizione di corretti protocolli diagnostici che consentano di implementare gli interventi terapeutici mirati per il contenimento efficace della PE, anche alla luce della necessità di un uso consapevole e razionale degli antimicrobici in allevamento. Nei macelli di alcuni Paesi del Nord Europa è già operativo un sistema di sorveglianza delle lesioni intestinali causate da *L. intracellularis* che prevede l'esame in parallelo, utilizzando qPCR, esame istologico ed immunoistochimico, di tratti di ileo prossimi alla valvola ileo-ciecale. I risultati vengono ritenuti ottimali per stimare la presenza di forme subcliniche in allevamento³⁶.

PROFILASSI E CONTROLLO

La profilassi e il controllo della PE si basano su quattro tipologie di interventi (misure di igiene ambientale e biosicurezza interna; alimentazione; impiego di antibiotici; vaccinazione) che possono essere implementati singolarmente o in associazione in funzione delle caratteristiche epidemiologiche della malattia in allevamento e della tipologia dell'azienda.

Misure di igiene ambientale e biosicurezza interna

L'applicazione di rigorosi protocolli di pulizia e disinfezione e di procedure AIAO sono fondamentali per diminuire la prevalenza di PE³⁷. Numerosi disinfettanti (sali quaternari d'ammonio, aldeidi, agenti ossidanti) inattivano *L. intracellularis* in 10-30 minuti e possono essere impiegati per ridurre la contaminazione dell'ambiente. È probabile che l'ambiente della mag-

gior parte degli allevamenti di suini sia contaminato da quantità elevate di *L. intracellularis* presente nel materiale fecale che permane all'interno delle strutture anche dopo le procedure di pulizia e disinfezione oppure sulle attrezzature o altri fomite. Lo spostamento di materiale fecale da aree contaminate ad altre aree della stessa azienda si verifica più comunemente nelle aziende a sito singolo. In queste condizioni, a temperature medio-basse, *L. intracellularis* può sopravvivere per circa 2 settimane. È quindi possibile che la contaminazione ambientale possa causare l'infezione dei nuovi gruppi di suini introdotti in queste strutture. L'infezione può diffondersi con velocità diverse e con variazioni nell'età di insorgenza della malattia sia in allevamenti diversi, sia nella stessa azienda, sia tra gruppi diversi all'interno dello stesso edificio³⁸.

Il trasferimento di feci contaminate si può realizzare anche tramite vettori animati quali insetti e roditori entrati a contatto con le feci di suino. Sperimentalmente è stato inoltre dimostrato che i topi si possono infettare e trasmettere *L. intracellularis* a suini esposti alle loro feci²⁰. Pertanto, i roditori possono avere un ruolo importante nell'introduzione, nel mantenimento e nella trasmissione di *L. intracellularis*. Ne consegue che la derattizzazione rappresenta una importante misura per il controllo della PE.

L'assenza, anche per un periodo di anni, di forme cliniche di PE in un allevamento convenzionale non è garanzia di indennità da *L. intracellularis*. Gli animali che provengono da tali allevamenti possono essere responsabili dell'introduzione del patogeno in popolazioni naïve, spesso seguita da un focolaio epidemico di forme emorragiche acute di PE e successivamente endemizzazione di forme croniche²⁴.

Alimentazione

La somministrazione di colture pure di *L. intracellularis* a suini *germ-free* non è in grado di indurre l'infezione che si realizza, invece, somministrando il contenuto intestinale di animali infetti³⁹. Questa osservazione suggerisce che le caratteristiche dell'ambiente intestinale e la composizione quali-quantitativa del microbiota possano influenzare la sopravvivenza di *L. intracellularis* o modulare la sua patogenicità. La composizione della dieta e la sua granulometria possono anche influenzare le probabilità di infezione⁴⁰. Ad esempio, le diete pellettate sono associate a livelli più elevati di *L. intracellularis* nel microbiota ileale rispetto a quelle non pellettate⁴¹. Per valutare l'eventuale effetto delle materie prime, sono stati condotti anche alcuni test *in vivo*: tre diverse diete a diversa inclusione percentuale di *distiller* di cereali non hanno modificato la situazione, mentre diete a base di orzo e avena hanno ridotto l'incidenza di forme cliniche rispetto alle diete di controllo. Anche l'orzo intero non macinato e le diete macinate grossolanamente hanno ridotto la frequenza di comparsa di forme cliniche da *L. intracellularis*. L'influenza che questi aspetti dell'alimentazione hanno sulle probabilità di sviluppo di forme cliniche da *L. intracellularis* è simile a quella osservata anche per altri patogeni intestinali quali *Salmonella*⁴². La loro implementazione permette quindi di controllare contemporaneamente più patologie.

Sempre in relazione alle materie prime, basandosi anche sulle ultime ricerche *in vitro*, si devono prendere in considerazione alcuni fattori generali che valgono per tutte le diete correlate a qualsiasi patologia del grosso intestino. I fattori chiave sono due: sarebbe preferibile utilizzare fonti proteiche ad altissima digeribilità, in modo che la massima quantità possibile di pro-

teina venga assorbita a livello del piccolo intestino, riducendo al minimo il flusso in transito da questa porzione intestinale verso il grosso intestino. L'eventuale quota indigerita, una volta raggiunti ileo e cieco-colon, non farebbe altro che fermentare e squilibrare la microflora intestinale inducendo la presenza di grandi quantità di batteri indesiderati che altererebbero la funzionalità della mucosa intestinale. Allo stesso modo la fibra, che deve essere a sua volta identificata in diverse frazioni, modifica la composizione della popolazione batterica dell'intestino ed agisce sulla motilità intestinale. A differenza delle proteine, la quota strutturale identificata come componente della parete cellulare (lignina, cellulosa, emicellulosa, pentosani, pectine) e definita come "lentamente fermentescibile", dovrebbe essere in grado di raggiungere in quantità le porzioni più distali dell'intestino in modo da condizionarne la motilità, stimolando soprattutto le contrazioni longitudinali, e selezionare una popolazione batterica più utile alla corretta funzionalità dell'apparato digerente. Tuttavia, l'impiego di diete con elevata quantità di questa frazione non ha fornito risposte definitive. Per quanto riguarda gli additivi, tutti i probiotici e prebiotici che, in modo aspecifico, concorrono a rinforzare l'adesione delle giunzioni "T" tra gli enterociti e/o mantengono integre la lunghezza dei villi e la profondità delle cripte, possono essere di aiuto per migliorare lo stato sanitario di tutto l'apparato intestinale. A questo proposito, in Spagna, alcune filiere hanno effettuato test *in vivo* sulla presenza di *L. intracellularis* in feci di suini Iberici allevati all'aperto, rilevando un aumento sistematico e significativo nei valori di Ct relativi alla quantificazione, mediante qPCR, di *L. intracellularis* nelle feci, testando come additivi pannello di colza idrolizzato, segale fermentata e colture del fungo *Agaricus subrufescens*, utilizzati con ottimi risultati sia nell'alimentazione suina sia in quella umana per il controllo di *Salmonella*. Tra gli acidi organici, l'aggiunta di acido formico non ha comportato alcun miglioramento della prevalenza di forme cliniche da *L. intracellularis*, mentre dosi di acido lattico del 2,4% sembrano avere qualche effetto positivo, fermo restando la sua impossibilità di applicazione per l'eccessivo costo addizionale. In ogni caso, i meccanismi con i quali la dieta o il microbiota intestinale influenzano la colonizzazione intestinale di *L. intracellularis* rimangono ancora poco chiari.

Impiego di antibiotici

Gli antimicrobici sono utilizzati a scopo terapeutico per controllare i focolai di PE, permettendo di ridurre rapidamente la progressione dell'epidemia. In passato, gli antimicrobici sono stati tuttavia utilizzati anche in senso profilattico, mediante somministrazione di massa nell'alimento o nell'acqua di abbeverata.

La scelta del farmaco è fondamentale per ottenere il migliore risultato possibile. Tuttavia, le informazioni sulla sensibilità *in vitro* di *L. intracellularis* sono scarse. La ragione principale di questa mancanza di informazioni è rappresentata dalla difficoltà di isolare *L. intracellularis* dai campioni fecali o intestinali degli animali infetti. *L. intracellularis* è un batterio intracellulare obbligato, replica solo all'interno di cellule coltivate *in vitro* e non può essere isolato con le comuni tecniche batteriologiche. Ne consegue che i metodi standard di valutazione della sensibilità antimicrobica non possono essere utilizzati ma vanno adattati tenendo in considerazione le specificità di questo microrganismo⁷. L'isolamento richiede personale esperto e diversi mesi per ottenere una coltura pura di *L. intracel-*

lularis. Di conseguenza, la valutazione della sensibilità *in vitro* del ceppo di *L. intracellularis* responsabile del focolaio di PE è impossibile da ottenere in tempo utile.

Sperimentalmente, alte dosi di tiamulina, tilosina e clortetraciclina sono in grado di prevenire l'infezione da *L. intracellularis* se somministrate in maniera continuativa nel mangime⁴³. Tuttavia, una volta sospesa la somministrazione di questi antibiotici, i suini rimangono immunologicamente naïve e sono pienamente recettivi^{42,43}. Inoltre, l'uso prolungato di antibiotici può aumentare la possibilità che altre specie batteriche sviluppino antibiotico-resistenza.

In passato sono state anche applicate alcune strategie terapeutiche in grado di prevenire le forme cliniche di malattia ma di consentire l'infezione da *L. intracellularis* e permettere quindi lo sviluppo di una immunità attiva nei confronti di una eventuale re-infezione. La somministrazione di antibiotici con l'alimento veniva sospesa per 12-18 giorni e poi pulsata nel mangime o in acqua a dosi elevate per 2-4 giorni ogni 2-3 settimane per prevenire la comparsa delle forme cliniche. Durante il periodo di mancata somministrazione di antibiotici i suini si infettavano e sviluppavano una immunità specifica⁴³.

La preoccupazione dell'opinione pubblica relativa allo sviluppo di fenomeni di antibiotico-resistenza e la necessità di un uso consapevole dei farmaci ha portato a individuare strategie alternative per controllare la PE e per ridurre l'uso profilattico degli antibiotici.

Le attuali strategie relative alla riduzione dei fenomeni di resistenza limitano considerevolmente l'impiego in senso profilattico degli antibiotici, prevedendo il trattamento dei soli casi singoli o dei gruppi di animali sintomatici individuati mediante un corretto percorso diagnostico. In queste situazioni, vengono considerati efficaci tilosina, enrofloxacin, tetracicline, tiamulina e tilmicosina mentre sono considerati non efficaci penicilline, bacitracina, neomicina, virginiamicina e ionofori. L'individuazione, mediante la valutazione dell'incremento dei titoli anticorpali degli animali, dell'arco di tempo in cui si sviluppa l'infezione all'interno dell'allevamento consente di stabilire con relativa precisione il momento in cui iniziare la somministrazione degli antibiotici che dovrà essere realizzata circa 3 settimane prima del picco di sieroconversione (Figura 1).

Vaccinazione

L'infezione naturale da *L. intracellularis* produce una risposta immunitaria sia umorale (IgG e IgA locali mucosali) che cellulo-mediata che è il presupposto da raggiungere con la vaccinazione per contenere l'infezione da *L. intracellularis*.

È disponibile da tempo un vaccino vivo attenuato, somministrabile oralmente, in genere nell'acqua di abbeverata o nell'alimento in broda. Negli animali vaccinati le lesioni da PE sono meno gravi, la quantità di *L. intracellularis* nelle feci si riduce e migliora la risposta immunitaria specifica cellulo-mediata,⁴⁴. Nella mucosa ileale dei suini vaccinati è stata inoltre osservata la presenza di IgG e IgA specifiche. Valutazioni di campo indicano che la vaccinazione è economicamente vantaggiosa e che la quantità di antibiotici utilizzata negli allevamenti affetti da PE si riduce⁴⁵. Trattandosi di un vaccino vivo attenuato, è consigliabile interrompere la somministrazione di qualsiasi antibiotico almeno 3 giorni prima e 3 giorni dopo la vaccinazione.

Dal 2016 è commercialmente disponibile un vaccino inattivato, somministrabile in un'unica dose per via intramuscolare a partire da 3 settimane di età. Anche per questa tipologia di vac-

cino è stata dimostrata una risposta sierologica specifica oltre alla riduzione della gravità delle lesioni da PE e della quantità di *L. intracellularis* presente nelle feci⁴⁷.

CONCLUSIONI

A quasi 40 anni dalla dimostrazione che il microorganismo oggi denominato *Lawsonia intracellularis* è il responsabile di forme di adenomatosi intestinale nel suino ed in altre specie, numerose questioni restano ancora aperte. Le particolarità di questo batterio non consentono un approccio diagnostico classico e questo condiziona sia la corretta valutazione della prevalenza della malattia sia la valutazione di eventuali fenomeni di antibiotico-resistenza. Inoltre, la presenza di eliminatori asintomatici costringe, come per altri agenti eziologici di malattie del suino (es. PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae*), al ricorso a tecniche diagnostiche che siano in grado non tanto di rilevare la semplice presenza dell'agente eziologico ma di valutarne la quantità all'interno di escreti/secreti o nel contesto delle lesioni anatomopatologiche specifiche. È verosimile ritenere che, in alcuni contesti, queste oggettive difficoltà portino a sottovalutare la reale importanza sanitaria ed economica dell'enterite proliferativa o ad orientare il controllo mediante la somministrazione profilattica di antibiotici.

Per queste ragioni, il controllo della PE dovrebbe basarsi su una corretta valutazione epidemiologica, su un uso maggiormente responsabile dei farmaci, su misure di profilassi diretta anche di tipo alimentare e, dove necessario, sulla pianificazione di interventi vaccinali.

PORCINE PROLIFERATIVE ENTEROPATHY CAUSED BY LAWSONIA INTRACELLULARIS

SUMMARY

Porcine Proliferative Enteropathy (PE or ileitis) is an infectious enteric disease caused by the intracellular pathogen *Lawsonia intracellularis* (LI). PE is endemic in many countries and causes severe economic losses in swine production system worldwide due to reduction of daily weight gain, reduction of feed conversion ratio and increase of mortality and swine waste. In Europe, the prevalence of infected farms and infected animals is more than 90% and 40%, respectively. In PE, intestinal mucosa is thickened by uncontrolled proliferation of intestinal crypt cells while secretory cells and absorbent cells are decreased in number because LI prevents their maturation. Diarrhea is the consequence, due to reduced absorption and loss of amino acid and protein in intestinal lumen. Clinical forms are divided into acute (proliferative hemorrhagic enteropathy - PHE) and chronic form (porcine intestinal adenomatosis - PIA). Acute form affects animals from 4 to 12 weeks of age and is characterized by high mortality (>50%) and hemorrhagic diarrhea. Chronic form affects swine of 6-20 weeks of age and is characterized by pasty diarrhea. Based on morphological findings, two other forms are reported: necrotic enteritis (NE) and regional ileitis (RI). The first is a chronic form complicated by secondary infection that result in coagulative necrosis of intestinal epithelium. Healing of necrotic enteritis lesions results in both thickening of muscular layer of intestinal wall and granulation tissue deposition, both of which are typical findings of RI. In-

direct diagnosis (e.g. ELISA) assess the exposure to *L. intracellularis* while direct diagnosis (PCR, qPCR, Immunohistochemistry -IHC) assess the current infection. Effective diagnosis is obtained comparing quantitation of microorganism/gram of feces with the detection of *L. intracellularis* within intestinal lesion. Prophylaxis and control of proliferative enteropathy are based on biosecurity measures combined with strict washing and disinfection measures to reduce environmental contamination. Proper nutrition management helps to ensure the balance of intestinal microflora by the use of highly digestible protein, by correct intake of fiber fraction and with probiotic and prebiotic supplements. To limit subclinical forms of disease, vaccination should replace antibiotic treatments which instead should be reserved only for symptomatic groups of pig.

KEY WORDS

Lawsonia intracellularis; proliferative enteropathy; swine.

Bibliografia

- Karuppanan A.K., Opriessnig T. (2018). *Lawsonia intracellularis*: Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs. *Front Vet Sci*, 5: 181.
- Arnold M., Crien A., Swam H., von Berg S., Jolie R., Nathues H. (2019). Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different European countries. *Porcine Health Manag*, 5: 31.
- McOrist S., Gebhart C.J., Boid R., Barns S.M. (1995). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Bacteriol*, 45: 820-825.
- Vannucci F.A., Borges E.L., de Oliveira J.S., Guedes R.M. (2010). Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol*, 145: 286-291.
- Lawson G.H., McOrist S., Jasni S., Mackie R.A. (1993). Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J Clin Microbiol*, 31: 1136-1142.
- Vannucci F.A., Gebhart C.J. (2014). Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Pathol*, 51: 465-477.
- Wattanaphansak S., Pereira C.E.R., Kaenson W., Assavacheep P., Tantilertcharoen R., Resende T.P., Barrera-Zarate J.A., de Oliveira-Lee J.S.V., Klein U., Gebhart C.J., Guedes R.M.C. (2019). Isolation and in vitro antimicrobial susceptibility of porcine *Lawsonia intracellularis* from Brazil and Thailand. *BMC Microbiol*, 19: 1-7.
- Kroll J.J., Roof M.B., Hoffman L.J., Dickson J.S., Harris D.L. (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev*, 6: 173-197.
- McOrist S., Jasni S., Mackie R.A., MacIntyre N., Neef N., Lawson G.H. (1993). Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. *Infect Immun*, 61: 4286-4292.
- Baroch J.A., Gagnon C.A., Lacouture S., Gottschalk M. (2015). Exposure of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States to selected pathogens. *Can J Vet Res*, 79: 74-78.
- Yeh J.Y. (2014). Seroprevalence of porcine proliferative enteropathy among wild boars in the Republic of Korea. *BMC Vet Res*, 10: 1-4.
- Pearson H.E., Toribio J.L.M.L., Lapidge S.J., Hernández-Jover M. (2016). Evaluating the risk of pathogen transmission from wild animals to domestic pigs in Australia. *Prev Vet Med*, 123: 39-51.
- Pusterla N., Gebhart C. (2009). Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Equine Vet Educ*, 21: 415-419.
- Cooper D.M., Swanson D.L., Gebhart C.J. (1997). Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet Microbiol*, 54: 47-62.
- Vannucci F.A., Foster D.N., Gebhart C.J. (2013). Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC Genomics*, 14: 421.
- Sampieri F., Vannucci F.A., Allen A.L., Pusterla N., Antonopoulos A.J., Ball K.R., Thompson J., Dowling P.M., Hamilton D.L., Gebhart C.J. (2013). Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Can J Vet Res*, 77: 261-272.
- Pusterla N., Gebhart C.J., Lavoie P., Drolet R. (2014). *Lawsonia intracellularis*. In: *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*, D.C. Sellon, M.T. Long, Editors. W.B. Saunders. p. 316-320.
- Guedes R.M., Gebhart C.J., Winkelmann N.L., Mackie-Nuss R.A., Marsteller T.A., Deen J. (2002). Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can J Vet Res*, 66: 99-107.
- Johansen M., Nielsen M., Dahl J., Svendsmark B., Baekbo P., Kristensen C.S., Hjulsgaard C.K., Jensen T.K., Stahl M., Larsen L.E., Angen O. (2013). Investigation of the association of growth rate in grower-finishing pigs with the quantification of *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus type 2. *Prev Vet Med*, 108: 63-72.
- Gabardo M.P., Sato J.P.H., Daniel A.G.S., Andrade M.R., Pereira C.E.R., Rezende T.P., Otoni L.V.A., Rezende L.A., Guedes R.M.C. (2017). Evaluation of the involvement of mice (*Mus musculus*) in the epidemiology of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, 205: 75-79.
- Guedes R.M., Gebhart C.J. (2003). Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol*, 91: 135-145.
- Jacobson M., Hård af Segerstad C., Gunnarsson A., Fellström C., de Verdier Klingenberg K., Wallgren P., Jensen-Waern M. (2003). Diarrhoea in the growing pig - a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci*, 74: 163-169.
- Jacobson M., Aspan A., Nordengrahn A., Lindberg M., Wallgren P. (2010). Monitoring of *Lawsonia intracellularis* in breeding herd gilts. *Vet Microbiol*, 142: 317-322.
- Vannucci F.A., Gebhart C.J., McOrist S. (2019). Proliferative enteropathy. In: J. J. Zimmerman, L. A. Kariker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, and Z. Jianqiang, editors. *Diseases of swine*. 11th ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons. p. 891-911.
- McOrist S., Jasni S., Mackie R.A., Berschneider H.M., Rowland A.C., Lawson G.H. (1995). Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res Vet Sci*, 59: 255-260.
- Vannucci F.A., Foster D.N., Gebhart C.J. (2012). Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia intracellularis* isolates in infected porcine cells. *PLoS One*, 7: e46708.
- McOrist S., Roberts L., Jasni S., Rowland A.C., Lawson G.H., Gebhart C.J., Bosworth B. (1996). Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J Comp Pathol*, 115: 35-45.
- Nougayrède J.P., Taieb F., De Rycke J., Oswald E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol*, 13: 103-110.
- Collins A.M., Love R.J. (2007). Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, 120: 381-386.
- Lawson G.H., Gebhart C.J. (2000). Proliferative enteropathy. *J Comp Pathol*, 122: 77-100.
- Guedes R.M. (2004). Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Swine Health Prod*, 12: 134-138.
- Lawson G.H., McOrist S. (1993). The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J Comp Pathol*, 108: 41-6.
- Guedes R.M., Winkelmann N.L., Gebhart C.J. (2003). Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Rec*, 153: 432-433.
- Pedersen K.S., Ståhl M., Guedes R.M., Angen Ø., Nielsen J.P., Jensen T.K. (2012). Association between faecal load of *Lawsonia intracellularis* and pathological findings of proliferative enteropathy in pigs with diarrhoea. *BMC Vet Res*, 8: 1-7.
- Burrough E.R., Rotolo M.L., Gauger P.C., Madson D.M. (2015). Correlation of *Lawsonia intracellularis* semi-quantitative fecal polymerase chain reaction assay results with the presence of histologic lesions of proliferative enteropathy and positive immunohistochemical staining. *J Swine Health Prod*, 23: 204-207.
- Jansen R., Janssen R., Steenaert M. (2018) Examination of ilea collected at slaughter for diagnosing porcine proliferative enteritis (PPE) in an early infected finisher herd. *Proc. 10th European Symposium of Porcine Health Management*, 247.
- Dors A., Pomorska-Mol M., Czyżewska E., Wasyl D., Pejsak Z. (2015). Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-

- finish swine herds. *Pol J Vet Sci*, 18: 825-831.
38. Hammer J.M. (2004). The temporal relationship of fecal shedding of *Lawsonia intracellularis* and seroconversion in field cases. *J Swine Health Prod*, 12: 29-33.
 39. McOrist S., Mackie R.A., Neef N., Aitken I., Lawson G.H. (1994). Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Rec*, 134: 331-332.
 40. Boesen H.T., Jensen T.K., Schmidt A.S., Jensen B.B., Jensen S.M., Moller K. (2004). The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. *Vet Microbiol*, 103: 35-45.
 41. Molbak L., Johnsen K., Boye M., Jensen T.K., Johansen M., Moller K., Leser T.D. (2008). The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet Microbiol*, 128: 96-107.
 42. Andres V.M., Davies R.H. (2015). Biosecurity measures to control *Salmonella* and other infectious agents in pig farms: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 14: 317-335.
 43. Collins A.M. (2013). Advances in Ileitis Control, Diagnosis, Epidemiology and the Economic Impacts of Disease in Commercial Pig Herds. *Agriculture*, 3: 536-555.
 44. Nogueira M.G., Collins A.M., Donahoo M., Emery D. (2013). Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. *Vet Microbiol*, 164: 131-138.
 45. Bak H., Rathkjen P.H. (2009). Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. *Acta Vet Scand*, 51: 1.
 46. Jacobs A.A.C., Harks F., Hazenberg L., Hoeijmakers M.J.H., Nell T., Pel S., Segers R. (2019). Efficacy of a novel inactivated *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. *Vaccine*, 37: 2149-2157.
 47. Roerink F., Morgan C.L., Knetter S.M., Passat M.H., Archibald A.L., Ait-Ali T., Strait E.L. (2018). A novel inactivated vaccine against *Lawsonia intracellularis* induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. *Vaccine*, 36: 1500-1508.
 48. Marcato P.S. (2015) *Patologia sistematica veterinaria*. Edagricole, Bologna.