

**CONGIUNTIVITE NEL SUINO SOSTENUTA DA *MYCOPLASMA*
SP. 1654_15. CANDIDATA NUOVA SPECIE STRETTAMENTE
CORRELATA A *MYCOPLASMA HYORHINIS***

**SWINE CONJUNCTIVITIS SUSTAINED BY *MYCOPLASMA*
SP. 1654_15. A NOVEL SPECIE CLOSELY RELATED TO
*MYCOPLASMA HYORHINIS***

CORNAGGIA M.¹, MERENDA M.¹, VIO D.², GASTALDELLI M.¹, CONCÌ V.¹,
GAGLIAZZO L.³, BOTTINELLI M.¹, SANDRI G.⁴, CATANIA S.¹

¹Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione Territoriale di Verona,
Laboratorio di Diagnostica Clinica e Sierologia di Piano, Buttapietra (VR), Italia.

²Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone,
Laboratorio di Patologia e Benessere della Specie Suina, Cordenons (PN), Italia

³Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Epidemiologia Veterinaria,
Legnaro (PD) Italia

⁴Soc.Ag. La Pellegrina Spa, Verona (VR), Italia

Parole chiave: congiuntivite suino, *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma* sp. 1654_15

Keywords: swine conjunctivitis, *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma* sp. 1654_15

RIASSUNTO

La congiuntivite è una patologia dal riscontro occasionale e sotto-diagnosticata nel suino. Essa può rappresentare un sintomo secondario di una patologia respiratoria o virale ovvero diretta conseguenza di eccessivi livelli di gas nocivi o di elevate quantità polvere nel capannone.

Nel 2020, una nuova specie di micoplasma denominata *Mycoplasma* sp. 1654_15, strettamente correlata a *Mycoplasma hyorhinitis* è stata riscontrata in un focolaio di congiuntivite in Germania. Alla luce di questa recente segnalazione, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di caratterizzare, tramite sequenziamento i ceppi di *Mycoplasma* spp. isolati in corso di congiuntivite in 4 aziende Italiane (A, B, C, D) e in precedenza identificati come *Mycoplasma hyorhinitis* per evidenziare eventuali correlazioni con *Mycoplasma* sp. 1654_15.

Tutti gli isolati testati sono risultati positivi per *Mycoplasma* sp. 1654_15 confermando la diffusione di questo patogeno emergente anche nel nostro territorio.

Vista l'elevata prossimità genetica tra *Mycoplasma* sp. 1654_15 e *Mycoplasma hyorhinitis* la loro differenziazione è attualmente possibile anche se non semplice; riteniamo opportuno aggiornare nel prossimo futuro l'offerta diagnostica al fine di fornire ai colleghi operanti nel settore un ulteriore strumento diagnostico giungere ad una corretta diagnosi.

ABSTRACT

Conjunctivitis is an uncommon finding in commercial swine herds, usually considered to be a secondary symptom of respiratory or viral systemic disease, or a result of irritation by dust or ammonia.

In 2020 in Germany a new species of *Mycoplasma*, so called *Mycoplasma* sp. 1654_15, strictly related to *Mycoplasma hyorhinitis*, was isolated in an outbreak of swine conjunctivitis. We investigated cases of conjunctivitis in 4 wean-to-finish swine farms (A, B, C, D) where *Mycoplasma hyorhinitis* was isolated and characterized.

A sequencing was conducted on all the isolated obtained by eye swabs and resulted positive for *Mycoplasma* sp. 1654_15, assuming that the pathogen is widespread also in Italy.

The common diagnostic tools available are not able to discern between *Mycoplasma* sp. 1654_15 and *Mycoplasma hyorhinis*. Therefore, new diagnostic tools are required to gain the correct diagnosis of swine conjunctivitis.

The inflammation of the conjunctiva represents a distress source that leads to a poor animal welfare condition, deputed to be a cause of aggressive behavior and a risk factor for diseases developing and cause of economic loss for the farm.

INTRODUZIONE

La congiuntiva è la sottile membrana mucosa che ricopre la superficie anteriore del bulbo oculare e la superficie interna delle palpebre. Batteri, virus e insulti ambientali possono innescare un processo flogistico chiamato congiuntivite. I segni clinici della congiuntivite sono caratterizzati da scolo oculare sieroso, mucoso o purulento. Edema ed emorragia della congiuntiva, accompagnati da eccessiva lacrimazione. Quest'ultima può manifestarsi anche secondariamente a ostruzione del dotto naso-lacrimale a seguito di rinite (17).

Sulla congiuntiva, si ripercuotono affezioni generali dell'organismo di vario tipo, quali malattie infettive sistemiche o setticemiche, reazioni allergiche e disturbi del metabolismo (p.e. l'ittero).

Tra gli agenti infettivi causa diretta di congiuntivite nel suino, si riscontrano numeri virus, quali: il virus della Peste Suina Classica (PSC), il virus della Peste Suina Africana (PSA), il virus della malattia di Aujeszky (PRV), il virus della rinite a corpi inclusi (PCMV), il virus dell'influenza suina (IAV) e il virus della sindrome respiratoria riproduttiva del suino (PRRS) (16,17).

La congiuntivite batterica primaria è sostenuta da *Chlamydia* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus hycus*, *Glaesserella parasuis* (10). In alternativa, essa può rappresentare una lesione secondaria di processi batterici sistemici sostenuti ad esempio da *Escherichia coli* (17). Le cause non infettive di congiuntivite sono rappresentate da situazioni ambientali critiche (eccesso di ammoniaca ed altri gas; polvere), traumi e corpi estranei, reazioni allergiche o morsicature da parte di insetti (10,17).

I micoplasmi sono descritti quali agenti eziologici di congiuntivite in diverse specie animali, quali gatti (9), piccoli ruminanti (5,13), bovini (1,11) e uccelli (4,6).

Anche nel suino, sono descritti i casi di congiuntivite sostenuta da micoplasmi, sebbene il loro significato patologico sia ancora poco chiaro (7,10,16).

Generalmente la congiuntivite nel suino non è considerata una malattia di pesante impatto economico e di conseguenza gli approfondimenti diagnostici sono spesso limitati ad escludere gravi infezioni virali, o problematiche diffuse a tutto l'effettivo.

I micoplasmi di importanza clinica nel suino sono: *M. hyopneumoniae*, agente primario della polmonite enzootica, *M. hyosynoviae*, riscontrato nelle artriti dei soggetti in ingrasso, *M. suis*, causa di anemia e turbe riproduttive, *M. hyorhinis*, riscontrato in forme di artrosinovite e polisierosite dei soggetti in svezzamento; *M. flocculare* e *M. hyopharyngis* sono considerati commensali delle vie aeree. Tra i micoplasmi suini, *M. hyorhinis* è stato riscontrato in alcuni casi di congiuntiviti (7,16). Hennig-Pauka e coll. (10) (2020) hanno dimostrato la presenza di un nuovo micoplasma, geneticamente correlato a *M. hyorhinis* (omologia del 98.80-99.11%), attualmente candidato *Mycoplasma* sp. 1654_15 causa di congiuntivite in 3 differenti allevamenti suini in Germania.

Alla luce delle più recenti evidenze scientifiche, lo scopo del lavoro è stato quindi quello di caratterizzare i ceppi di micoplasmi precedentemente isolati da episodi di congiuntivite apparsi nel 2015, 2016 e 2020 in 4 allevamenti situati nelle regioni Friuli-Venezia Giulia e Veneto al fine di individuare eventuali differenze o analogie con il candidato *Mycoplasma* sp. 1654_15.

MATERIALI E METODI

Un totale di 4 aziende suinicole professionali ad elevata capacità sono state interessate da fenomeni di congiuntivite nell'effettivo negli anni 2015 (azienda A e B), 2016 (azienda C) e 2020 (azienda D). Le aziende erano localizzate nelle provincie di Padova, Verona e Pordenone. L'allevamento A consisteva in un Sito 1 + 2 (2600 scrofe più svezzamento di quasi tutti i suinetti; circa 6.000/mese) le restanti aziende erano dei siti di ingrasso (sito 3).

Una visita clinica su un numero rappresentativo di animali è stata condotta dal Veterinario aziendale secondo buona prassi suiatrica. I segni clinici osservati erano caratterizzati da una congiuntivite bilaterale con edema e rossore della palpebra associata a rinite. Occasionalmente si osservava anche polmonite.

È stato formulato un quesito diagnostico di congiuntivite da *Mycoplasma* spp. e sono stati selezionati gli animali all'inizio della sintomatologia acuta, non trattati e rappresentativi del problema per un campionamento mirato al fine di procedere ad approfondimenti diagnostici. Nell'azienda A sono stati campionati un totale di sei animali, per i quali sono stati prelevati tamponi di congiuntiva, tamponi nasali e tamponi da parenchima polmonare. Nell'azienda B sono stati campionati un totale di otto tamponi di congiuntiva. Nell'azienda C sono stati prelevati tre tamponi nasali e uno di congiuntiva, nell'azienda D quattro tamponi ottenuti da congiuntiva.

I campioni sono stati consegnati al Laboratorio di Medicina Aviare afferente alla Struttura Complessa Territoriale 1 Verona e Vicenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) per essere sottoposti ad isolamento e successiva tipizzazione di *Mycoplasma* spp.

L'isolamento è stato condotto secondo procedura interna sviluppata in base a quanto prescritto dal Manuale diagnostico della World Organization for Animal Health (WOAH; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022 capitolo 3.3.5.e capitolo 3.4.8.). Ciascun tampone è stato stemperato in Mycoplasma Liquid Medium (Mycoplasma Experience Ltd, Bletchingley, UK) e FRIIS Liquid Medium (Centro Servizi Produzione, IZSVe, Padova, Italia). I brodi sono stati poi incubati a 37+/-1°C in termostato in atmosfera modificata con aggiunta del 5% di CO₂.

I brodi sono stati ispezionati ogni giorno per la ricerca di eventuale viraggio o intorbidimento della soluzione, indice di crescita microbiologica. I campioni sono stati considerati negativi dopo un'incubazione di 21 giorni senza il viraggio del brodo.

La crescita dei microrganismi è stata considerata di interesse quando è stata osservata una variazione colorimetrica del terreno di coltura, accompagnata da scarso o lieve intorbidimento del terreno. I campioni di interesse sono stati seminati in Mycoplasma Experience agar e Friis Agar per la valutazione macroscopica delle colonie e per il test della digitonina e nisina.

Le colonie di batteri appartenenti alla classe dei *Mollicutes* risultate sensibili alla digitonina e resistenti alla nisina sono state identificate come *Mycoplasma* spp. e sottoposte a identificazione molecolare.

La differenziazione delle diverse specie di *Mycoplasma* è stata effettuata mediante cicli di amplificazione della regione variabile del gene V3 nel DNA ribosomiale 16S (rDNA) (15). Il prodotto genico di reazione di ciascun campione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE) (12).

I campioni risultati positivi per *Mycoplasma hyorhinis* sono stati sottoposti ad amplificazione del segmento U1 – U5 degli operoni *rrnA* e *rrnB* del gene *16s* rRNA, sottoposto successivamente a sequenziamento al fine di procedere con l'identificazione a livello di genere e/o specie (14).

I campioni di *Mycoplasma hyorhinis* isolati dalla congiuntiva sono stati analizzati mediante un protocollo di PCR proposto da Hennig-Pauka e coll. (2020) per *Mycoplasma* sp. 1654_15 (10).

RISULTATI

L'isolamento di *Mollicutes* appartenenti al genere *Mycoplasma* ha dato esito positivo in tutte le aziende (A-D) e la DGGE è stata condotta su tutti i ceppi isolati.

Nello specifico, dall'azienda A *Mycoplasma hyorhinis* è stato riscontrato nel soggetto 1 (cavità nasale e polmone), nel soggetto 2 (congiuntiva), nel soggetto 3 (cavità nasale), nel soggetto 4 (cavità nasale e polmone) e nel soggetto 6 (cavità nasale e congiuntiva).

Nell'azienda B, *Mycoplasma flocculare* è stato riscontrato nelle cavità nasali del soggetto 1, mentre *Mycoplasma hyorhinis* dalla congiuntiva del soggetto 2 e dal naso dei soggetti 3 e 5. *Mycoplasma hyorhinis* è stato isolato dalla congiuntiva del soggetto 8 nell'azienda C e dal soggetto 4 dell'azienda D.

Il sequenziamento dei ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* isolati da congiuntiva nelle aziende A-D ha permesso di evidenziare un'omologia tra il 99.33 e il 99.91% per *Mycoplasma* sp. 1654_15.

Tutti i ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* isolati da congiuntiva nelle aziende A-D sono risultati positivi alla PCR per *Mycoplasma* sp. 1654_15.

DISCUSSIONE

Nel settore suinicolo alcune specie di micoplasmi svolgono un ruolo patologico noto ed importante. Essi sono causa di notevoli perdite economiche derivanti dal mancato accrescimento e dalla predisposizione allo sviluppo di forme batteriche secondarie di polmonite, riassumibili nel complesso della malattia respiratoria del suino (*Porcine respiratory disease complex-PRDC*) (17).

I micoplasmi sono inoltre causa di setticemie, artrosinoviti e turbe riproduttive con conseguente aumento della mortalità e consumo di farmaco (16,17).

Sebbene la congiuntivite rappresenti un problema marginale dell'allevamento suino; essa rappresenta una fonte di stress per gli animali, che porta inevitabilmente ad una riduzione delle condizioni di benessere animale, con conseguenze severe sull'incremento ponderale e con ripercussioni negative su comportamenti aggressivi quali la morsicatura della coda, dei capezzoli e delle orecchie (2).

La congiuntivite può rappresentare un campanello di allarme della presenza di livelli elevati di gas nocivi nei locali di stabulazione ($\text{NH}_3 > 20$ ppm) che può manifestarsi come rossore delle congiuntive associato a lacrimazione eccessiva (2) ovvero manifestazione di gravi malattie sistemiche; risulta quindi essenziale un'accurata valutazione dei fenomeni clinici di irritazione della congiuntiva da parte del Medico Veterinario.

Sebbene gli episodi di congiuntivite da *Mycoplasma hyorhinis* siano saltuariamente riportati, la possibilità che esso possa rappresentare un problema è noto da tempo (8). La congiuntivite da micoplasma è inoltre riportata sia negli Stati Uniti (16) che in Germania (10). L'isolamento di *Mycoplasma* in episodi di congiuntivite in aziende localizzate sul suolo italiano conferma la circolazione del patogeno nel nostro territorio.

Mycoplasma sp. 1654_15 risulta essere particolarmente correlato a *Mycoplasma hyorhinis* con il quale condivide un'omologia genetica del 98.80-99.11% (10) e ciò è confermato anche dai dati del nostro sequenziamento.

Hennig-Pauka e coll. ipotizzano che *Mycoplasma* sp. 1654_15 sia originato da *Mycoplasma hyorhinis* attorno al 2005 (10) e i risultati di questo studio supporta tale ipotesi in quanto il primo riscontro in Italia risale al 2015.

Allo stato attuale presso i nostri laboratori, la diagnosi di tale nuovo micoplasma prevede l'isolamento ed il successivo sequenziamento, in futuro al fine di rendere più rapido lo screening potrebbe essere necessario mettere a punto una nuova RT-PCR per *Mycoplasma* sp. 1654_15 come proposto da Hennig-Pauka e coll. (10).

CONCLUSIONI

La congiuntivite rappresenta una problematica minore nell'allevamento suino, tuttavia essa può essere una manifestazione di distress degli animali e di non ottimali condizioni di benessere; questa patologia risulta spesso sotto-diagnosticata e pertanto, ad oggi, non è possibile stimare una prevalenza della patologia nella popolazione suina italiana.

Il campione diagnostico idoneo risulta essere il tampone congiuntivale prelevato in condizioni di sterilità da animali all'inizio della sintomatologia clinica, non trattati e rappresentativi del problema; in alternativa, al fine di una valutazione anatomopatologica ed istopatologica la carcassa o parte di essa è ritenuta un campione altrettanto valido.

L'isolamento di *Mycoplasma* sp. 1654_15 in corso di congiuntivite necessita di ulteriori approfondimenti diagnostici al fine di chiarire l'eventuale ruolo patogeno di questo nuovo micoplasma. Inoltre, vista la capacità dei micoplasmi di evolvere e adattarsi con notevole rapidità (3) è sempre bene mantenere alta l'attenzione in particolare in un settore zootecnico ad alta specializzazione come quello del suino. Tutto ciò al fine di ridurre per quanto possibile il rischio di riarrangiamenti o l'occupazione di nuove nicchie ecologiche da parte di questi microrganismi, la cui linea evolutiva si caratterizza per la rapida capacità di adattamento.

In futuro, si prevede la necessità che i laboratori diagnostici si adoperino per fornire, ai medici veterinari operanti nel settore, strumenti diagnostici utili ad evidenziare il *Mycoplasma* sp. 1654_15, al fine di mantenere la dovuta attenzione per questa *new entry* nel settore suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberti A., Addis M.F., Chessa B., Cubeddu T., Profiti M., Rosati S., Ruiu A., Pittau M. (2006) Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18(1):41-51.
2. Alborali Giovanni Loris, Maisano Antonio Marco, Santucci Giovanni, Scali Federico, Bertocchi Luigi. (2019) Benessere Animale: Linee Guida per la Categorizzazione del Rischio Nell'allevamento Suino Dallo Svezamento All'ingrasso Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale Ministero della Salute :1-143
3. Ciccarelli F.D., Doerks T., Von Mering C., Creevey C.J., Snel B., Bork P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311(5765):1283-1287.
4. Dhondt A.A., DeCoste J.C., Ley D.H., Hochachka W.M. (2014) Diverse wild bird host range of *Mycoplasma gallisepticum* in eastern North America. *PLoS One* 9(7):e103553.
5. Fernández-Aguilar X., Cabezón Ó, Marco I., Mentaberre G., Frey J., Lavín S., López-Olvera J.R. (2013) *Mycoplasma conjunctivae* in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. *BMC veterinary research* 9(1):1-5.
6. Forsyth M.H., Tully J.G., Gorton T.S., Hinckley L., Frasca Jr S., Van Kruiningen H.J., Geary S.J. (1996) *Mycoplasma sturni* sp. nov., from the conjunctiva of a European starling (*Sturnus vulgaris*). *Int.J.Syst.Bacteriol.* 46(3):716-719.
7. Friis N.F. (1976) A serologic variant of *Mycoplasma hyorhinis* recovered from the conjunctiva of swine. *Acta Vet.Scand.* 17(3):343-353.
8. Friis N.F. (1976) A serologic variant of *Mycoplasma hyorhinis* recovered from the conjunctiva of swine. *Acta Vet.Scand.* 17(3):343-353.
9. Haesebrouck F., Devriese L.A., Van Rijssen B., Cox E. (1991) Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. *Vet.Microbiol.* 26(1-2):95-101.
10. Hennig-Pauka I., Sudendey C., Kleinschmidt S., Ruppitsch W., Loncaric I., Spersger J. (2020) Swine conjunctivitis associated with a novel mycoplasma species closely related to *Mycoplasma hyorhinis*. *Pathogens* 10(1):13.

11. Langford E.V., Leach R.H. (1973) Characterization of a mycoplasma isolated from infectious bovine keratoconjunctivitis: *M. bovoculi* sp. nov. *Can.J.Microbiol.* 19(11):1435-1444.
12. McAuliffe L., Ellis R.J., Lawes J.R., Ayling R.D., Nicholas R.A. (2005) 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J.Med.Microbiol.* 54(8):731-739.
13. Motha M., Frey J., Hansen M.F., Jamaludin R., Tham K.M. (2003) Detection of *Mycoplasma conjunctivae* in sheep affected with conjunctivitis and infectious keratoconjunctivitis. *N.Z.Vet.J.* 51(4):186-190.
14. Pettersson B., Leitner T., Ronaghi M., Bölske G., Uhlen M., Johansson K. (1996) Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J.Bacteriol.* 178(14):4131-4142.
15. Poveda J.B., Nicholas R., Miles R., Nicholas R. (1998) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104, *Mycoplasma Protocols*.
16. Resende T.P., Pieters M., Vannucci F.A. (2019) Swine conjunctivitis outbreaks associated with *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 31(5):766-769.
17. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Stevenson G.W., Schwartz K.J. (2012) *Diseases of swine*. John Wiley & Sons,