

RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO DI VALUTAZIONE DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI COME MATRICE PER LA RICERCA DI MICOPLASMI

PRELIMINARY RESULTS OF A STUDY FOR THE EVALUATION OF PROCESSING FLUIDS AS SAMPLE FOR MICOPLASMAL DETECTION

USTULIN M.¹, ROSSI E.², TARGHETTA C.¹, CAPORAL A.¹, VIO D.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,
Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

² Libera professionista, Montebelluna (TV)

Parole chiave: emosieri testicolari, micoplasmi

Keywords: processing fluids, Mycoplasma

RIASSUNTO

Recenti dati bibliografici hanno evidenziato la possibilità di rilevare *M. hyopneumoniae* da emosieri testicolari. All'evidenza non comune della presenza di questo patogeno al di fuori dell'apparato respiratorio si aggiunge la potenziale possibilità di utilizzare questa tipologia di campione aggregato per lo studio delle dinamiche di infezione di *M. hyopneumoniae* e, in analogia con altre patologie del suino, per il monitoraggio aziendale.

Questo studio supporta la possibilità di evidenziare *M. hyopneumoniae* da emosieri testicolari e aggiunge la possibilità di riscontrare la presenza di *M. hyorhinitis*; la rilevazione precoce del patogeno potrebbe portare interessanti informazioni epidemiologiche utili anche a chiarire le modalità di trasmissione nelle prime fasi di vita del suino.

ABSTRACT

Recent publication suggest the possibility for *M. hyopneumoniae* to be found from processing fluids. This pathogen has been rarely found outside the respiratory tract and evidence of early transmission can induce to re-evaluate its epidemiology. Moreover, the possibility of using processing fluids, a group sample, for monitoring of *M. hyopneumoniae* can be of interest.

The present study support the possibility to evidence *M. hyopneumoniae* from processing fluids and include the observation of *M. hyorhinitis* in this particular sample.

INTRODUZIONE

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) è un batterio particolarmente esigente e rappresenta l'agente eziologico primario della polmonite enzootica, patologia respiratoria cronica nel suino; in ragione della capacità di *M. hyopneumoniae* di aderire alle ciglia delle cellule epiteliali delle vie respiratorie, il batterio è in grado di ridurre la clearance polmonare, favorendo infezioni batteriche (Zilieski e Ross, 1992).

I danni causati da *M. hyopneumoniae* sono tenuti sotto controllo tramite la vaccinazione e, nei casi più critici, tramite terapia antimicrobica; in entrambe le situazioni, seppure si rilevi il contenimento e la riduzione delle lesioni polmonari e, indirettamente dei danni economici, non si previene la colonizzazione delle vie aeree e gli animali pertanto continuano ad albergare il patogeno nelle prime vie respiratorie ed in particolare nelle tonsille, permettendone la trasmissione per via respiratoria, attraverso aerosol contaminato da animale infetto ad animale sano con diffusione, anche rapida, all'interno del gruppo. La polmonite enzootica, inizia

generalmente a manifestarsi in animali in accrescimento; la rapidità di diffusione e la precocità dei sintomi dipendono dal numero di animali infetti e dalla precocità di infezione (Thacker, 2008). In caso di polmonite enzootica la *restitutio ad integrum* delle lesioni polmonari non è mai completa; le lesioni cicatriziali polmonari e le aderenze pleuriche possono permanere per tutta la vita dell'animale determinando il deprezzamento delle carcasse al macello.

Gli studi finora eseguiti hanno messo in evidenza lo spiccato tropismo di *M. hyopneumoniae* per le vie respiratorie del suino, tuttavia un recente report ha evidenziato la presenza di questo patogeno negli emosieri testicolari, ovvero i liquidi di percolamento dei testicoli dei suinetti e delle code raccolti durante le procedure di castrazione e di taglio della coda (Vilata et al., 2019). Questa evidenza, se confermata, suggerisce una potenziale affinità di questo micoplasma per l'apparato riproduttore, in analogia a quanto già noto per micoplasmi aviari e per *Mycoplasma bovis* (Nicholas et al., 2003), in ragione della quale potrebbero essere riconsiderate le vie di trasmissione e, di conseguenza, l'epidemiologia dell'infezione da *M. hyopneumoniae*.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato svolto in un allevamento da riproduzione a ciclo aperto con parti settimanali in cui erano state precedentemente rilevate problematiche respiratorie riferibili a patologia da micoplasmi, confermate da indagini di laboratorio, in cui vengono allevate circa 550 scrofe.

Le scrofette, nate in azienda vengono vaccinate per *M. hyopneumoniae* a 7 giorni, a 30 giorni e 180 giorni e per PCV2 a 30. I suinetti sono sottoposti allo stesso programma vaccinale e vengono venduti a circa 80 giorni di vita.

Il programma vaccinale completo applicato in allevamento prevede per le scrofette la vaccinazione per *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Parvovirus e Leptospirosi a 170 e 190 giorni, per Influenza suina a 90 e 110 giorni, *Actinobacillus pleuropneumoniae* a 120 e 150 giorni, PRRS a 200, 220, 310 giorni di vita. Le primipare vengono vaccinate per E. coli a circa 60 giorni di gestazione. L'intero parco scrofe viene vaccinato per *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Parvovirus e Leptospirosi e per Influenza suina ogni 6 mesi e per PRRS ogni 4 mesi.

Il protocollo di campionamento ha previsto la raccolta settimanale per 6 settimane consecutive degli emosieri testicolari nel periodo dicembre 2019 – gennaio 2020 suddividendo le nidiate dei riproduttori inclusi nello studio secondo l'ordine di parto. I campioni sono stati conferiti refrigerati entro 48 ore dal prelievo alla Sezione Territoriale di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Ciascun campione è stato analizzato per *M. hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) tramite multilex real time PCR. La procedura di prova prevede una fase di estrazione degli acidi nucleici utilizzando l'estrattore automatico King Fisher Flex (ThermoFisher scientific) e il kit MagMAX core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher Scientific). Il protocollo di PCR è un protocollo *in house* che utilizza come target un tratto specie-specifico del gene 16S di *M. hyorhinis* (Cavijo et al., 2014) e del gene p102 di *M. hyopneumoniae* (Marois et al., 2009).

RISULTATI

Nel corso del monitoraggio di sei settimane sono stati raccolti 13 campioni di emosieri testicolari che hanno incluso le nidiate di 106 scrofe di diverso ordine di parto.

Le analisi hanno evidenziato una positività per *M. hyopneumoniae* in un gruppo di secondipare e una positività in un gruppo di pluripare. A questo si aggiunge una positività per *M. hyorhinis* da un gruppo di pluripare.

Il numero di animali campionati, l'ordine di parto del gruppo e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 1.

| | Numero nidiate | Ordine di parto | <i>M. hypneumoniae</i> | <i>M. hyorhins</i> |
|-------------|----------------|-----------------|------------------------|--------------------|
| Settimana 1 | 7 | Secondo parto | Pos | Neg |
| | 5 | Terzo parto | Neg | Neg |
| | 12 | Pluripare | Neg | Neg |
| Settimana 2 | 5 | Secondo parto | Neg | Neg |
| | 12 | Pluripare | Neg | Neg |
| Settimana 3 | 7 | Secondo parto | Neg | Neg |
| | 12 | Pluripare | Neg | Neg |
| Settimana 4 | 11 | Pluripare | Neg | Pos |
| | 10 | Pluripare | Pos | Neg |
| Settimana 5 | 4 | Pluripare | Neg | Neg |
| | 5 | Pluripare | Neg | Neg |
| Settimana 6 | 9 | Primo parto | Neg | Neg |
| | 7 | Pluripare | Neg | Neg |

Tab. 1 Risultati/results

DISCUSSIONE

Nonostante il numero contenuto di campioni incluso in questa valutazione della presenza di Micoplasmia patogeni per il suino in emosieri testicolari, è stato possibile riscontrare campioni positivi non solo per *M. hypneumoniae*, già recentemente segnalato in bibliografia, ma anche per *M. hyorhins*. A nostra conoscenza non vi sono precedenti segnalazioni di questo Micoplasmia in emosieri testicolari, per quanto un certo tropismo per l'apparato riproduttivo potesse essere suggerito dall'osservazione di positività per questo batterio dai secreti vaginali di scrofe (Ustulin et al., 2019).

Per quanto possa apparire anomala la presenza negli emosieri testicolari di *M. hyorhins* e ancora di più di *M. hypneumoniae*, considerato esclusivamente un patogeno dell'apparato respiratorio, un'indagine bibliografica suggerisce che il ritrovamento a livello di apparato riproduttore in altre specie animali e nell'uomo di Micoplasmia patogeni, non sia un fatto eccezionale: *M. bovis*, che nella specie bovina oltre a polmoniti e artriti può essere causa di mastiti e infertilità (Nicholas et al., 2003), *Mycoplasma gallisepticum*, che causa patologia respiratoria nel pollo, può essere trasmesso per via verticale (Raviv et al., 2013), *Mycoplasma pneumoniae*, generalmente considerato un patogeno respiratorio nell'uomo, è stato isolato dal tratto urogenitale (Goulet et al., 1995).

E' stato dimostrato che *M. hypneumoniae* colonizzi i suinetti durante il periodo di lattazione, che la scrofa sia la principale fonte di infezione (Calsamiglia e Pijoan, 2000) e che la prevalenza di positività in PCR delle cavità nasali delle scrofe, inteso come numero di animali escretori del gruppo, sia un fattore di rischio (Pieters et al., 2014).

L'evidenziazione di Micoplasmia negli emosieri testicolari mette in luce la possibilità potenziale di utilizzare questa matrice come campione aggregato per la valutazione della circolazione di Micoplasmia in allevamento. L'analisi di campioni aggregati viene largamente utilizzata per il monitoraggio di patologie del suino in quanto permette di aumentare la sensibilità diagnostica a livello aziendale includendo un maggior numero di soggetti nel campione senza aumentare

eccessivamente il numero di campioni e, di conseguenza, i costi relativi alle analisi. Oltre agli emosieri testicolari, i fluidi orali rappresentano una dei campioni aggregati più largamente utilizzati ma si sono dimostrati scarsamente adatti al monitoraggio dei *M. hyopneumoniae* (Hernandez-Garcia et al., 2017).

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo studio, ottenuti tramite real time PCR, e per i quali è prevista la validazione anche tramite esame culturale, supportano la possibilità di rinvenire in emosieri testicolari *M. hyopneumoniae* recentemente suggerita da dati pubblicati in letteratura ed evidenziano che anche per *M. hyorhinis* possa esservi tale possibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Calsamiglia M., Pijoan C. (2000) "Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sow. *Vet Rec* 146, 530-532.
2. Clavijo M.J., Oliveira S., Zimmerman J., Rendahl A., Rovira A. (2014). Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhinis*. *J Vet Diagn Invest.* 2014 Nov;26(6):755-60. doi: 10.1177/1040638714555175. Epub 2014 Oct 15.
3. Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J., 2007. "Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs" *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71, 195–200
4. Goulet M, Dular R, Tully JG, et al. "Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract." *J Clin Microbiol* 1995;33:2823–5
5. Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. "The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex." *Porcine Health Manag.* 2017 Apr 5;3:7. doi: 10.1186/s40813-017-0055-4. eCollection 2017.
6. Nicholas R.A., Aiyling R.D. "Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control". *Res Vet Sci.* 2003 Apr;74(2):105-12.
7. Marois C., Dory D., Fablet C., Madec F., Kobisch M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J Appl Microbiol.* 2010 May;108(5):1523-33. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04556.x. Epub 2009 Oct 7.
8. Raviv, Z. & Ley, D.H. (2013). "Mycoplasma gallisepticum infection." In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, & V.L. Nair (Eds.), *Diseases of Poultry* (pp. 877–893). Ames, IA: Wiley-Blackwell.
9. Pieters M., Cline G.S., Payne B.J., Prado C., Ertl J.R., rendhal A.K. (2014) "Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age". *Vet. Microbiol.*, 172 (2014), pp. 575-580
10. Thacker E. L. "Mycoplasmal Diseases" (2008) in *Diseases of swine* 9th edition, Blackwell Publishing (2006), 387-417.
11. Ustulin M., Catania S., Gobbo F., Fincato A., Targhetta C., Toson M., Vio D., (2019) "Studio sulla trasmissione di *Mycoplasma hyorhinis*". *Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, XLV Meeting Annuale.*
12. Vilata C., Sanhueza J.M., Murray D., Johnson L., Pieters M. (2019) "Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets processing fluids. *VetRec* 26;185(16):510. doi:10.1136/vetrec-105475.
13. Zielinski GC, Ross RF. (1992). "Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*." *Am J Vet Res.* 1992 Jul;53(7):1119-24.