

**DINAMICA SIEROLOGICA DELL'INFEZIONE DA PRRSV
E MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN UN GRUPPO DI
SCROFETTE DI UN'AZIENDA DA RIPRODUZIONE.**

**SEROLOGICAL DYNAMIC OF PRRSV AND MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE INFECTIONS IN A GROUP OF GILTS
FROM A FARROW-TO-WEANER HERD.**

DE MATEO AZNAR, M.^{1, 2}; CEGLIE L.¹; CARNIELETTO P.¹;
BORTOLETTO G.³; ROSSETTO G.⁴; DRIGO M.³; NARDELLI S.¹.

¹*Istituto Zooprofilattico delle Venezie – Legnaro (PD);*

²*Scuola di Specializzazione in Patologia Suina - Università degli Studi di Parma;*

³*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria -
Università degli Studi di Padova;*

⁴*Veterinario libero professionista (Pordenone);*

Parole chiave: PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, sierologia, ELISA, acclimata-
mento, suino

Key words: PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, serology, ELISA, acclimatization,
swine

Riassunto. Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) e il *Mycoplasma hyopneumoniae* sono considerati due dei più importanti patogeni associati alla sindrome respiratoria nell'industria suinicola. La dinamica dell'infezione di PRRSV, sia a livello sierologico (ELISA) che virologico (RT-PCR), è stata valutata in 15 scrofette di una azienda suina da riproduzione per un periodo di 18 mesi. Gli stessi campioni di siero sono stati usati per confrontare l'andamento anticorpale verso *M. hyopneumoniae* mediante due kit ELISA commerciali, indiretto e competitivo, per valutare il loro uso a fini diagnostici soprattutto nel confronto della vaccinazione. I risultati riguardanti la PRRS hanno evidenziato l'infezione di tutti i soggetti durante il periodo d'acclimata-
mento e la reinfezione dopo quasi un anno con un ceppo eterologo introdotto postero-
riormente in allevamento. Il confronto dei kit ELISA per la ricerca degli anticorpi verso *M. hyopneumoniae* ha rilevato una moderata correlazione tra i kit, con un livello di reattività marcatamente inferiore nella reazione indiretta, e una dinamica non correlata alla vaccinazione.

Abstract. The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* are considered two of the most important pathogens associated to respiratory syndrome in the swine industry. The PRRSV infection's dynamic has been studied on 15 gilts, both through serology (ELISA) and virology (RT-PCR), in a swine reproduction farm for 18 months. The same serum samples have been used to compare the dynamic of antibodies against *M. hyopneumoniae* through two commercial ELISA kits, indirect and competitive, to evaluate their use for diagnosis purposes especially in case of vaccination. The results concerning PRRS have shown that all the subjects have been infected during the acclimatization and that a reinfection occurred after almost one

year with an heterologous strain introduced later in the farm. The comparison of the two ELISA kits for the detection of antibodies against *M. hyopneumoniae* has shown a moderate correlation between the two kits, with a reactivity level strongly lower in the indirect reaction, and a dynamic not correlated to vaccination.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le patologie respiratorie nel suino hanno acquisito un'importanza rilevante per le ingenti perdite economiche da esse causate e dovute principalmente al calo dei parametri produttivi, all'elevata mortalità e ai costi dei medicinali. Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) e il *Mycoplasma hyopneumoniae* sono considerati tra i principali agenti responsabili delle malattie respiratorie nelle aziende suine (Thacker et al., 1998). Per queste ragioni l'industria suinicola cerca di ottimizzare le strategie di prevenzione e controllo, basate sulla gestione aziendale o in combinazione alla vaccinazione e ai trattamenti antibiotici mirati.

La PRRS è una delle malattie infettive del suino più importanti in gran parte del mondo manifestandosi con sintomi respiratori dallo svezzamento all'ingrasso ed episodi abortivi tardivi nelle scrofe. L'epidemiologia di questa malattia è assai complicata perché il virus presenta caratteristiche molto particolari quali l'elevata variabilità genetica e la capacità di produrre infezioni persistenti. La conoscenza della trasmissione e della persistenza del virus sono indispensabili per avere successo nel limitare i danni causati dalla malattia. L'obiettivo del controllo della PRRS si basa sulla stabilizzazione del reparto riproduttivo, in modo da impedire la trasmissione tra scrofe o tra scrofa e suinetto. Gli allevamenti virologicamente instabili sono il risultato dell'introduzione di una rimonta mal acclimatata o infetta e per evitarlo sono state messe a punto diverse strategie di controllo basate sulla vaccinazione e/o quarantena e acclimatamento della rimonta. L'acclimatamento della rimonta consiste nell'esposizione dei nuovi riproduttori allo stipite presente in allevamento prima d'entrare in produzione (Dee et al., 1996). Le modalità d'esposizione sono principalmente due: la sieroinfezione e il contatto diretto con animali infetti dell'allevamento. La sierologia e la rilevazione del virus mediante RT-PCR sono utili strumenti per valutare la dinamica dell'infezione della PRRS nella rimonta (Batista, 2005)

La vaccinazione è uno strumento notevolmente diffuso per il controllo delle infezioni da *M. hyopneumoniae*. I principali benefici della vaccinazione sono la riduzione dei sintomi clinici, delle lesioni polmonari e dei costi dei medicinali e il miglioramento dei parametri produttivi (Maes et al., 2008). A livello del reparto riproduttivo, la vaccinazione delle scrofette è raccomandata in allevamenti infetti endemicamente per evitare la destabilizzazione dell'immunità (Bargen, 2004)

L'efficacia della vaccinazione varia tra individui e non è stata dimostrata la correlazione tra concentrazione di anticorpi nel siero e protezione verso l'infezione da *M. hyopneumoniae* (Thacker et al., 1998). La risposta anticorpale dopo la vaccinazione varia tra vaccini e, in assenza d'infezione naturale, diminuisce sotto i livelli di rilevazione dopo 1-3 mesi (Maes et al., 2008). In linea generale, la percentuale di animali che sieroconvertono dopo la vaccinazione non è molto elevata (Sibila et al., 2004)

Questo lavoro ha lo scopo di valutare: 1) la dinamica dell'infezione da PRRSV in un gruppo di 15 scrofette in un allevamento convenzionale per un periodo di 1,5 anni, assai

più prolungato di quelli riportati in bibliografia; 2) la risposta anticorpale verso *M. hyopneumoniae*, in relazione ai trattamenti vaccinali ed alla reazione sierologica utilizzata.

MATERIALE E METODI

Allevamento

Le scrofe analizzate appartengono ad un allevamento da riproduzione a ciclo aperto localizzato in pianura Padana, con circa 1500 scrofe produttive. L'azienda è positiva per PRRSV e la circolazione virale avviene principalmente nei reparti svezzamento/magronaggio. Il tasso di rimonta è del 40% e consiste nell'introduzione di scrofette di 3-4 settimane d'età e peso di 6 kg provenienti da un centro genetico PRRS negativo e con rare lesioni da *Mycoplasma hyopneumoniae*. In tale azienda è previsto un programma d'acclimatamento lungo 6-7 mesi per facilitare l'infezione delle scrofette prima dell'entrata in produzione. Questo programma d'acclimatamento prevede le seguenti fasi:

- Tre settimane nel reparto svezzamento a contatto diretto con i suinetti presenti.
- Cinque settimane nel reparto magronaggio a contatto diretto con i magroni presenti.
- Tre mesi nel reparto accrescimento a contatto diretto con i suinetti dello svezzamento; questi sono utilizzati come eliminatori eventuali di virus e vengono sostituiti ogni 2 settimane per cercare di garantire il massimo delle possibilità di infezione con il ceppo di PRRS presente in allevamento.
- Alla fine di questi 3 mesi, le scrofette vengono spostate in un reparto di stimolazione, fecondate e mai più spostate fino all'entrata in sala parto. Questo accorgimento consente di tenere separate le pluripare dalle primipare riducendo la possibilità di trasmissione virale tra animali di diverso status sierologico.

L'azienda è inoltre storicamente positiva per la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae*. Per quanto riguarda il piano vaccinale, è da segnalare che sono previsti 3 interventi (a 4, 7 e 12 settimane) con un vaccino commerciale verso *Mycoplasma hyopneumoniae*. Non è invece prevista la vaccinazione verso la PRRS.

Campionamento

In questa ricerca sono state campionate longitudinalmente le scrofette di un gruppo di rimonta dal momento della loro entrata in azienda per un periodo di circa un anno e mezzo. Sono stati prelevati 18 campioni di sangue intero per animale rispettando il seguente schema:

- Dalla 4^a alla 13^a settimana di vita: prelievo di sangue settimanale
- Dalla 13^a settimana di vita fino alla fine dello studio: prelievi di sangue trimestrali.

Il giorno di arrivo in azienda (4 settimane di vita) sono state scelte casualmente 15 scrofette da un totale di 52. Purtroppo 2 animali hanno perso l'orecchino dopo la venticinquesima settimana di vita, al momento della entrata in produzione, e quindi il numero di animali rimasti disponibili per lo studio longitudinale sono 13.

Indagini di laboratorio

I campioni sono stati processati in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo. Il siero ottenuto dopo centrifugazione a 3000 rpm/min per 10 minuti a + 4°C, è stato aliquotato e congelato in attesa dell'esecuzione dell'ELISA e della Reverse Transcription-Polymerase

Chain Reaction (RT-PCR). In totale sono stati analizzati 255 campioni di sangue.

- RT-PCR PRRS

La metodica amplifica un frammento in posizione 3'-terminale della regione conservata localizzata nell'ORF 7 sia del ceppo virale US che di quello EU mediante una PCR-multiplex 2-step (Persia et al., 2001)

I campioni di siero sono stati analizzati in pool fino a un massimo di 5 campioni e in caso di pool positivo è stata eseguita la RT-PCR sul campione singolo.

- ELISA

La ricerca degli anticorpi verso PRRSV è stata compiuta con un kit commerciale HerdCheck® PRRS ELISA 2X Idexx Laboratories-USA. La presenza o assenza di anticorpi si basa sul rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P): il campione è considerato positivo quando $S/P \geq 0,40$. Per l'esecuzione dell'analisi sono state seguite le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

La ricerca degli anticorpi verso *Mycoplasma hyopneumoniae* è stata fatta con 2 kit ELISA commerciali. Per l'esecuzione dell'analisi sono state seguite le istruzioni fornite dalla ditta produttrice:

- indiretto: HerdCheck® *Mycoplasma hyopneumoniae* Idexx Laboratories-USA. La presenza o assenza di anticorpi si basa sul rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P): i campioni con un valore $S/P \geq 0,4$ sono stati riconosciuti come positivi, quelli $< 0,3$ come negativi e i valori compresi tra 0,3 e 0,4 come dubbi.
- competitivo: *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA, Oxoid, UK (in passato conosciuto come DAKO). L'interpretazione dei risultati si basa nel confronto tra il siero in esame e il controllo antigene 100 % (AG100%): valore di % d'inibizione (% I) ≥ 50 % dell'AG100% sono considerati positivi; % I < 35 % dell'AG 100% sono considerati negativi; valori di % I tra 35 e 50% AG 100% sono stati ritenuti dubbi.

Analisi statistica

- Concordanza tra i kit ELISA: valore *kappa*

Il coefficiente *kappa di Cohen* è un metodo che determina la concordanza tra due osservazioni o test oltre la casualità. Si deve considerare che il coefficiente *kappa* misura la forza della concordanza tra i test: questo non fornisce una comparazione con il "gold standard" o uno stato conosciuto di malattia.

RISULTATI

Infezione da PRRSV

La dinamica dell'infezione della PRRS è rappresentata nel grafico 1.

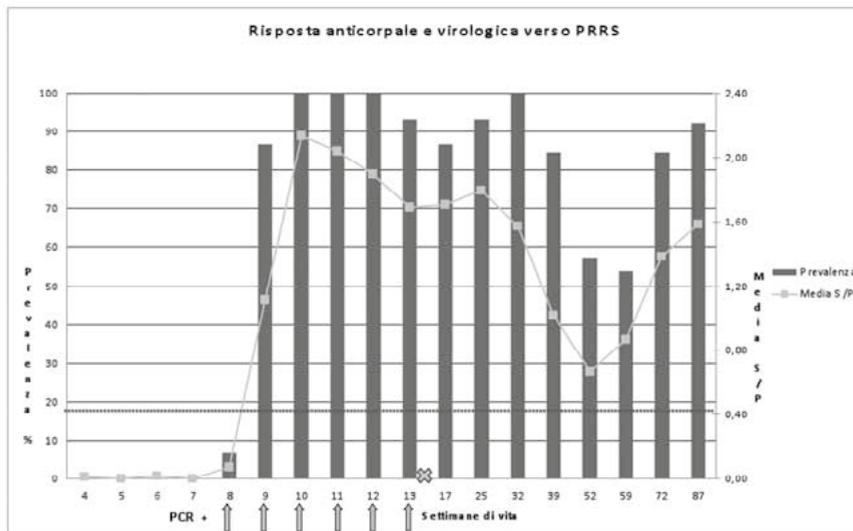


Grafico 1: Dinamica dell'infezione della PRRS mediante ELISA e RT-PCR
Graphic 1: Infection dynamic of PRRS by ELISA and RT-PCR

Si possono distinguere 2 fasi:

- Fase 1 (dalla 4^a fino alla 52^a settimana di vita):
Tutti gli animali s'infettano con PRRSV del genotipo Europeo allo spostamento nel magronaggio. La maggior parte degli animali presenta una viremia di 4 settimane; soltanto 2/15 animali rimangono viremici per 3 settimane e 2/15 per 5 settimane.
La sieroconversione avviene in parallelo alla viremia: 13/15 animali sieroconverte a 9 settimane di vita, quando 14/15 sono viremici. A 13 settimane, soltanto 1/15 animali rimane viremico. Finito il periodo di viremia, gli anticorpi calano progressivamente.
- Fase 2 (dalla 59^a fino alla 87^a settimana di vita):
A 1 anno di vita circa (59 settimane) la prevalenza si attesta al 54% (7/13) con un valore medio S/P = 0,87. In questo momento la situazione è molto variabile da capo a capo con 5/13 animali con valore medio S/P tra 0 e 0,1 e 5/13 con S/P > 1 (dati non mostrati). Dopo la 59^a settimana si osserva un aumento della prevalenza e del valore medio S/P fino alla fine del periodo d'osservazione ma non è stato riscontrato alcun pool positivo per PRRSV.

Infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*

La dinamica sierologica del *Mycoplasma hyopneumoniae* è rappresentata nel grafico 2 (kit indiretto) e 3 (kit competitivo).

Grafico 2: Dinamica sierologica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* mediante ELISA indiretto
Graphic 2: Dynamic of *M. hyopneumoniae* antibody levels by indirect ELISA

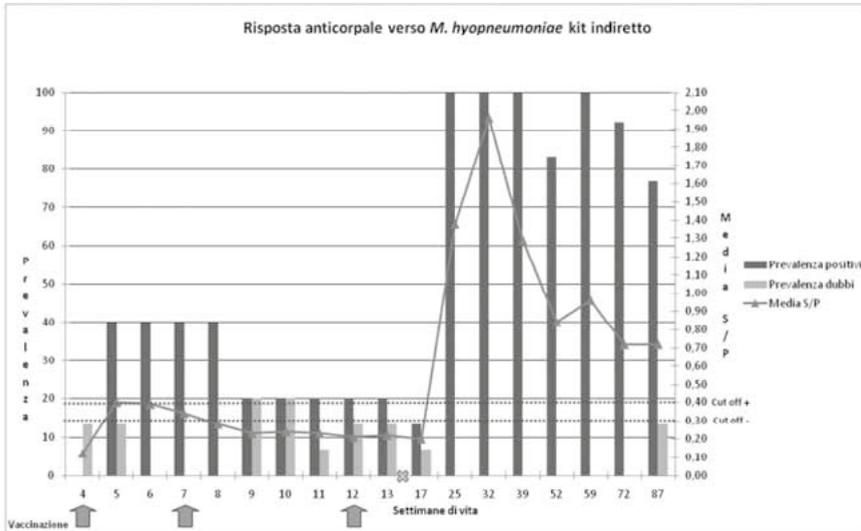
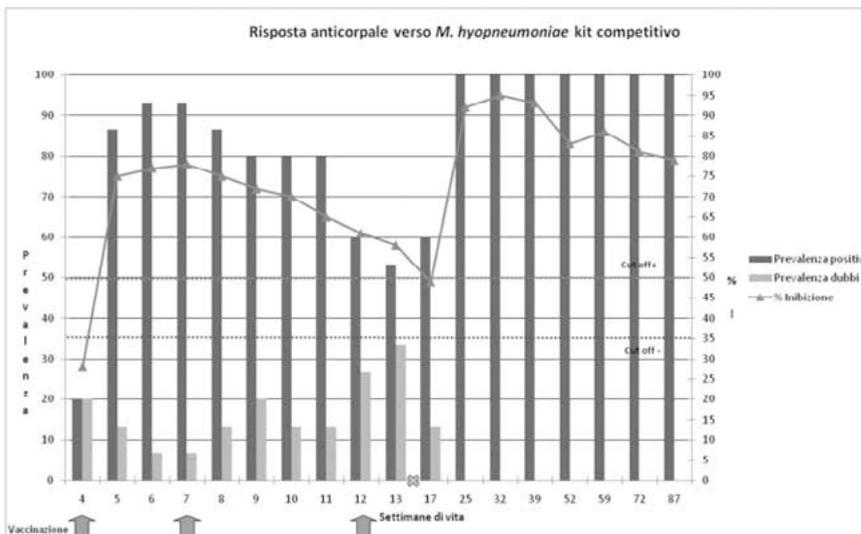


Grafico 3: Dinamica sierologica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* mediante ELISA competitivo
Graphic 3: Dynamic of *M. hyopneumoniae* antibody levels by competitive ELISA



Si possono distinguere 2 fasi:

- Fase 1 (dalla 4^a alla 17^a settimana di vita):
Le scrofette all'arrivo presentano un livello di anticorpi basso per entrambi i kit, addirittura quasi nullo per il kit indiretto.
Dopo 1 settimana dall'entrata in allevamento si osserva per entrambi i kit un innalzamento tanto della prevalenza quanto del valore medio S/P e di % I. Questo innalzamento è molto evidente per il kit competitivo a 7 settimane di vita, arrivando a un valore massimo di prevalenza del 93% e di % I del 78%. Per il kit indiretto, i valori massimi, anche se di modesta entità, si raggiungono più precocemente, a 5 settimane di vita con un valore medio S/P di e prevalenza del 53%.
Il secondo e terzo intervento vaccinale a 7 e 12 settimane di vita non comportano nessun incremento dei valori in entrambi i kit. Per il kit competitivo tanto la prevalenza quanto la % I calano progressivamente fino alla 17^a settimana di vita anche se la % I si mantiene comunque nel range di positività. Invece per quanto riguarda il kit indiretto, i valori di prevalenza e di S/P medio calano subito dopo la 5^a settimana di vita, negativizzandosi dalla 8^a settimana di vita in poi.
- Fase 2 (dalla 17^a fino alla 87^a settimana di vita):
Dalla 25^a settimana entrambi i kit dimostrano il 100% prevalenza e a 32 settimane si raggiungono i valori massimi di S/P medio = 1.96 e % I = 95.
Dopo questa evidente sierconversione, il kit competitivo mantiene valori molto elevati di prevalenza e di % I fino alla fine dello studio. Anche il kit indiretto dimostra alti livelli di prevalenza (80%) fino alla fine dello studio, ma, pur mantenendosi sopra il cut-off presenta un marcato calo del valore S/P medio (0.72).

Il riassunto dei risultati di entrambi i kit è rappresentato nella tabella 1.

Esito		Indiretto			Totale
		Positivi	Dubbi	Negativi	
Competitivo	Positivi	121	16	64	201
	Dubbi	0	1	26	27
	Negativi	0	1	22	23
Totale		121	18	112	251

Tabella 1: Risultati ottenuti dall'analisi sierologica verso *M. hyopneumoniae* effettuata con i kit ELISA indiretto e competitivo (251 campioni)

Table 1: *M. hyopneumoniae* serological results by indirect and competitive ELISA

La concordanza tra i kit calcolata mediante il valore kappa è moderata: $k = 0.246$ (CL 95% 0.175 – 0.317, $p=0,036$). L'analisi delle discordanze rivela che il kit competitivo presenta un maggior numero di positivi in confronto al kit indiretto. Il 43% (107/251) dei campioni presenta discordanza, l'87% (93/107) dei quali in fase 1, dove il 73% (68/93) sono positivi al kit competitivo e dubbi/negativi per il kit indiretto. I 14 campioni discordanti in fase 2 appartengono a due categorie di animali: quelli all' inizio della seconda sierconversione e quelli alla fine dello studio, fase peraltro nella quale i titoli sono decisamente in calo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

PRRSV

L'avvenuta infezione, dimostrata mediante sieroconversione e viremia da parte della totalità delle scrofette prelevate in questo studio, indica che il programma d'acclimatamento nei confronti del PRRSV è stato efficace. I risultati sierologici (inizio sieroconversione dopo 2-3 settimane dall'entrata nel magronaggio) e virologici (1 mese di viremia) concordano, in termine di livelli e durata, con i dati di altre ricerche simili (Batista et al., 2004). La fase 1 può essere considerata il risultato del programma d'acclimatamento.

La fase 2 è l'effetto dell'introduzione di un ceppo eterologo in azienda dimostrata da: innalzamento dei valori anticorpali nelle scrofe in studio, aumento dei processi abortivi in tutte le categorie di scrofe dell'allevamento durante le 52^a e 72^a settimana di vita delle scrofe in studio, viremia nei suinetti sotto scrofa 3 mesi dopo la sieroconversione delle scrofe e l'analisi filogenetica dei ceppi di PRRSV (dati non mostrati). La mancata rilevazione di PRRSV nelle scrofe in studio tra le 52 e le 59 settimane può essere dovuta al fatto che le reinfezioni possono dare viremia con durata inferiore rispetto alla prima infezione e che la finestra temporale tra i prelievi è stata di 7 settimane.

Purtroppo la mancata presenza di un gruppo di controllo all'interno dello stesso allevamento non permette di confrontare le performance riproduttive.

Mycoplasma hyopneumoniae

L'impiego di due diversi kit sullo stesso gruppo di campioni permette di evidenziare una frequenza di esito positivo nettamente superiore nella reazione competitiva rispetto a quella indiretta, situazione che si traduce in una concordanza moderata tra i test. Perciò a fini diagnostici non si può considerare equivalente l'impiego dell'uno o dell'altro kit. Questo riscontro è attribuibile alla diversa sensibilità riportata per i due kit (Erlandson et al., 2005).

La dinamica anticorpale nel tempo non si dimostra associabile agli interventi vaccinali: delle due sieroconversioni, una si manifesta in assenza di vaccinazioni e inoltre alle 2 vaccinazioni di richiamo non corrisponde alcun rialzo anticorpale. Quest'andamento è in linea con quanto già osservato da Gradellini et al. (2008) in un lavoro che ha riguardato un arco temporale più breve e in cui i prelievi sono iniziati immediatamente dopo il secondo intervento vaccinale.

La non disponibilità del dato di PCR non consente di associare con certezza i due rialzi anticorpali con la presenza attiva del *Mycoplasma*, ma questa appare la spiegazione più plausibile. Merita comunque attenzione la coincidenza temporale fra sieroconversione verso *M. hyopneumoniae* e la movimentazione degli animali: la prima conversione è coincisa infatti con l'arrivo in azienda, mentre la seconda con il passaggio delle scrofette nel reparto di fecondazione.

References

- Bargen L.E., (2004) "A System Response to an Outbreak of Enzootic Pneumonia in grow/finish Pigs" *Can. Vet. J.*, 45, 856-859.
- Batista L., (2005) "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Diagnostics in the Breeding Herd: Back to the Basics." *J. Swine Health Prod.*, 13, 96-98.
- Batista L., Pijoan C., Dee S., Olin M., Molitor T., Joo H.S., Xiao Z., Murtaugh M., (2004) "Virological and Immunological Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in a Large Population of Gilts" *Can. J. Vet. Res.*, 68, 267-273.
- Dee S.A., Joo H.S., Henry S., Tokach L., Park B.K., Molitor T., Pijoan C., (1996) "Detecting Subpopulations After Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Large Breeding Herds using Multiple Serologic Tests" *J. Swine Health Prod.*, 4, 181-184.
- Erlandson K.R., Evans R.B., Thacker B.J., Wegner M.W., Thacker E., (2005) "Evaluation of Three Serum Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for *Mycoplasma Hyopneumoniae*." *Journal of Swine Health and Production*, 13, 198-203.
- Gradellini S., Nardellini S., Mazzoni C., Borri E., De Mateo Aznar M., Ceglie L., Granato A., Boscarato M., Schiavon E., Tonon F., (2008) "Dinamica Dell'Infezione Di *Mycoplasma Hyopneumoniae* e PRRS Virus in Un Allevamento a Ciclo Chiuso Con Sistema Di Svezzamento a Bande Trisettimanali." *Atti XXXIV Meeting Annuale SIPAS*, 479-492.
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F., (2008) "Control of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Infections in Pigs" *Vet. Microbiol.*, 126, 297-309.
- Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G., (2001) "Evaluation of Three RT-PCR Assays for the Detection of Porcine and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Diagnostic Samples." *Proceedings of the 10th International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*, 440-441.
- Sibila M., Calsamiglia M., Vidal D., Badiella L., Aldaz A., Jensen J.C., (2004) "Dynamics of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Infection in 12 Farms with Different Production Systems" *Can. J. Vet. Res.*, 68, 12-18.
- Thacker E., Thacker B.J., Boettcher T., Jayappa H., (1998) "Comparison of Antibody Production, Lymphocyte Stimulation and Production Induced by Four Commercial *Mycoplasma Hyopneumoniae bacterins*" *J. Swine Health Prod.*, 6, 107-112.