

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN SUINI DI TRE SETTIMANE DI ETÀ IN DIVERSI PAESI EUROPEI

VILLARREAL, I. ^{*1}, JENSEN, J.C.E. ², NANJIANI, I.A. ³, MAES, D.1

¹Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium; ²Pfizer Ltd. EUAfME, 23-25 avenue du Docteur Lannelongue F-75668 Paris Cedex 14, ³Pfizer Ltd. VMRD, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ
*Corresponding Author

Parole chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, prevalenza, nPCR, tamponi nasali, suinetti sottoscrofa.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae* sono diffuse in tutto il mondo e causano le maggiori perdite nell'industria suinicola. Il controllo di *M. hyopneumoniae* può essere raggiunto ottimizzando il management e le pratiche di allevamento tramite medicazioni antibiotiche e vaccinazioni. In molti paesi europei, più della metà degli allevamenti applica la vaccinazione per controllare l'infezione (Maes et al., 2008). Vengono impiegati differenti programmi vaccinali, ma in molti casi, i suinetti vengono vaccinati una o due volte in sala parto o allo svezzamento.

Per implementare appropriate misure di controllo e ottimizzare ulteriori strategie vaccinali, è importante indagare l'andamento dell'infezione da *M. hyopneumoniae* negli allevamenti suini e, più specificamente, valutare la prevalenza e l'importanza delle infezioni che avvengono nei suinetti. Studi in un limitato numero di allevamenti in alcuni paesi hanno dimostrato che, per mezzo della nested PCR (nPCR) su tamponi nasali (Vicca et al., 2002; Calsamiglia et al., 1999), il 5-20% dei suinetti risultano positivi a *M. hyopneumoniae* (Palzer et al., 2006) allo svezzamento o poco dopo lo svezzamento.

L'obiettivo di questo studio è stato di verificare la prevalenza delle infezioni da *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età in diversi paesi europei, analizzando i tamponi nasali con nPCR.

MATERIALI E METODI

Allevamenti nello studio

Lo studio è stato condotto in 9 paesi europei: Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Ungheria, Italia, Olanda, Polonia e Spagna. In ciascun paese sono stati inclusi 6 allevamenti a ciclo chiuso o a ciclo aperto. Le aziende hanno dovuto soddisfare certi criteri di selezione come una dimensione d'allevamento di almeno 100 scrofe, presenza di problemi clinici correlati a *M. hyopneumoniae*, il non uso di antibiotici attivi verso *M. hyopneumoniae*, età dei suinetti inferiore a 3 settimane e disponibilità a cooperare con lo studio. Sono stati selezionati a random 30 suinetti da ciascun allevamento da scrofe il più differenti possibile. Le scrofe sono state raggruppate in 3 classi, cioè di 1° parto, 2-5° parto e oltre (>5° parto).

Tamponi nasali

In ogni allevamento, sono stati raccolti 30 tamponi nasali da suinetti di 21±3 giorni di età. I tamponi nasali sono stati ottenuti raschiando in profondità la mucosa nasale di ogni narice. Questa procedura è adeguata per la ricerca di *M. hyopneumoniae* nella pratica clinica di routine, data la facilità della raccolta di campioni nelle condizioni di campo (Otagiri et al., 2005). I tamponi nasali di ciascun paese sono stati congelati e inviati in ghiaccio secco per la successiva ricerca di *M. hyopneumoniae* nel laboratorio.

Analisi dei tamponi nasali

Il materiale raccolto in ciascun tampone nasale è stato messo in sospensione in 200µl PBS e il DNA è stato estratto secondo il protocollo standard QIAGEN per la purificazione del DNA totale da sangue e tessuti animali (QIAGEN, DNAeasy Blood & Tissue Kit, Belgium). Per la ricerca del DNA di *M. hyopneumoniae* è stato impiegato un test nPCR basato su un protocollo modificato descritto da Stärk et al. (1998). I prodotti della Nested PCR sono stati analizzati con elettroforesi su gel al 1.5% di agarosio in tampone di TBE e visualizzato sotto illuminazione UV dopo colorazione in GelRed™ (Biotium, Inc., CA, USA).

RISULTATI

Nella Tabella 1 viene presentato il numero di allevamenti e animali positivi dei diversi paesi. La percentuale totale di allevamenti e suini positivi è stata rispettivamente del 63% e 11%. A parte Belgio e Polonia per cui la campionatura è in corso, Germania, Italia e Olanda sono risultati i paesi con il più alto numero di allevamenti positivi per *M. hyopneumoniae*. La più alta percentuale di suini positivi nei paesi con un completo campionamento è stata in Germania e Italia.

Tabella 1. Il numero di allevamenti e suinetti (allo svezzamento) positivi per *M. hyopneumoniae* da nPCR su tamponi nasali nei diversi paesi EU

	Nr di allevamenti selezionati	% allevamenti positivi	Numero totale di suinetti (30 suinetti/allevamento)	% suinetti positivi
Belgio*	1	0%	0	0%
Danimarca	6	50%	3	2%
Francia*	4	100%	26	22%
Germania	6	80%	35	19%
Ungheria	6	50%	18	10%
Italia	6	80%	40	22%
Olanda	6	80%	14	8%
Polonia*	2	0%	0	0%
Totale	43	63%	145	11%

* Paesi in cui è ancora in corso la raccolta dei campioni

DISCUSSIONE

Il presente studio ha valutato la prevalenza di *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età in diversi paesi europei. I risultati hanno mostrato che nella maggior parte degli allevamenti, vi è stata già una evidenza di infezione da *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età con un significativo numero di animali risultati positivi. Questo suggerisce che le infezioni precoci da *M. hyopneumoniae* sono importanti negli allevamenti selezionati (Fano et al., 2005; Sibila et al., 2004, 2007). Poiché sono stati usati criteri specifici per selezionare gli allevamenti, i risultati non possono essere generalizzati come tutti gli allevamenti di suini in EU, ma solo come le aziende adatte ai criteri di selezione. Tuttavia, in termini di management e condizioni di allevamento, le aziende selezionate possono essere considerate rappresentative per molti altri allevamenti di suini in EU.

E' stata usata la Nested PCR su tamponi nasali per analizzare i campioni. Questo strumento diagnostico permette di rilevare meno di cinque organismi in un campione e il test è utile per monitorare le infezioni da *M. hyopneumoniae* in condizioni di campo (Thacker, 2004; Otagiri et al., 2005). I risultati dovrebbero essere interpretati a livello dell'allevamento, non a livello individuale (Otagiri et al., 2005). Poiché il naso non è il sito primario di moltiplicazione di *M. hyopneumoniae*, è probabile che i presenti risultati sottostimino il numero di animali infetti. In questo senso, si potrebbe ottenere una prevalenza più elevata esaminando il liquido del BAL (Verdin et al., 2000) poiché *M. hyopneumoniae* si attacca e si moltiplica sull'epitelio ciliato della trachea, dei bronchi e dei bronchioli (Zielinski et al., 1993). Prelevare il BAL è possibile in condizioni di campo, ma è tuttavia meno pratico e richiede più tempo che prelevare tamponi nasali. La sierologia non funzionerebbe nel presente studio poiché è impossibile distinguere tra anticorpi dovuti all'infezione e anticorpi materni. Inoltre, richiede almeno 4-6 settimane prima che i suini infetti possano mostrare anticorpi riscontrabili nel siero. La difficoltà di coltivare *M. hyopneumoniae* dai tamponi nasali potrebbe indicare se i suini sono stati infettati con organismi vivi di *M. hyopneumoniae*. Tuttavia la coltura di *M. hyopneumoniae* è assai difficile, costosa e richiede parecchio tempo, anche se vengono usati tessuto polmonare infetto o liquidi dal BAL. Pertanto, i tamponi nasali non sono adatti per la coltura di *M. hyopneumoniae*.

Una volta che i campionamenti di tutti gli allevamenti nei diversi paesi siano stati completati, si ricercherà quali fattori dell'allevamento siano significativamente correlati con la prevalenza dell'infezione nell'azienda e nell'animale. L'identificazione e la quantificazione di questi fattori di rischio permetterà di capire meglio l'epidemiologia delle infezioni precoci da *M. hyopneumoniae* negli allevamenti europei e di ottimizzare le misure di controllo.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'inestimabile assistenza di Hanne Vereecke, i veterinari e gli allevatori coinvolti nello studio, lo staff tecnico di campo e di Sandwich di Pfizer che ha facilitato la raccolta ed il trasporto dei campioni.

Bibliografia

- Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* 1999 May;11(3):246-51.
- Fano E, Pijoan C, Dee S. *Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence at weaning as a predictor of the groups' subsequent *Mycoplasma* status. Allen D. Leman Swine Conference-Proceedings, 2005: 109-113.
- Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 2008 Jan 25;126(4):297-309.
- Otagiri Y, Asai T, Okada M, et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *J. Vet. Med. Sci.* 2005 67(8): 801-805.
- Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. **Pathogenesis of pneumonic diseases in pigs of different age groups in bronchoalveolar lavage fluid.** IPVS Copenhagen 2006, p.289, Proc. Vol 2 (University of Munich).
- Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen JC. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can J Vet Res* 2004 Jan;68(1):12-8.
- Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Soria S, et al. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet Microbiol* 2007 Apr 15;121(3-4):352-6.
- Stark KD, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1998 Feb;64(2):543-8.
- Thacker EL. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim Health Res Rev* 2004 Dec;5(2):317-20.
- Verdin E, Saillard C, Labbe A, Bove JM, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet Microbiol* 2000 Sep 15;76(1):31-40
- Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, de KA. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002 Sep;49(7):349-53.
- Zielinski, G. C. & Ross, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res* (1993). 54, 1262–1269.