

SIEROTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* ISOLATI DAL SUINO NEL NORD ITALIA: AGGIORNAMENTO DEI RISULTATI

UPDATE ON SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF HAEMOPHILUS PARASUIS ISOLATES FROM PIGS IN NORTHERN ITALY

IODICE G.², GHERPELLI Y.¹, BONILAURI P.¹, MAIOLI G.¹, DOTTORI M.¹, MERIALDI G.,¹ LEONELLI R.¹, MERENDA M.¹, BIASI G.¹, LUPPI A.¹

1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
2- Veterinario Libero Professionista

Parole chiave: *Haemophilus parasuis*, immunodiffusione in agar gel, emoagglutinazione indiretta

Key words: *Haemophilus parasuis*, agar gel immunodiffusion, indirect haemoagglutination

Riassunto. Nel periodo 2007-2010 sono stati sierotipizzati 53 ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da altrettanti suini conferiti per accertamenti diagnostici presso la Sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Questi, sono stati sottoposti a sierotipizzazione impiegando il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) il quale ha previsto l'adozione di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13. La scelta e l'acquisto degli antisieri si è basata su dati di prevalenza riportati da diversi autori in altri paesi europei.

Diciannove dei suddetti ceppi, quelli relativi al periodo 2009-2010, sono stati ulteriormente testati mediante l'impiego della metodica di Emoagglutinazione Indiretta (IHA) presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory di Hannover dove sono stati utilizzati gli antisieri nei confronti di tutti i 15 sierotipi. Per questi ceppi è stato eseguito un confronto tra i risultati ottenuti con le due metodiche sopraccitate.

L'attività di sierotipizzazione ha evidenziato una netta prevalenza dei sierotipi 4 (32,08%), 13 (20,75%) e 5 (15,09%) confermando i risultati riportati in pubblicazioni precedenti sull'argomento. I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 24,53% di quelli esaminati. Il confronto tra AGID ed IHA ha fatto registrare risultati sovrapponibili per 14 ceppi su 19. Nei restanti 5 casi ai ceppi di *H. parasuis* non è stato assegnato alcun sierotipo a causa di fenomeni di cross-reazione (3/19) e di risultati contrastanti tra le due metodiche (2/19).

I risultati ottenuti hanno portato all'adozione di un protocollo diagnostico che prevede l'utilizzo dei due test in serie, impiegando l'AGID come test di screening e l'IHA come test alternativo e di conferma nei casi di mancata tipizzazione con il test AGID.

Abstract . From 2007-2009 a total of 53 *Haemophilus parasuis* field isolates were serotyped by Istituto Zooprofilattico of Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The serotyping was made by agar gel immunodiffusion test (AGID) using specific antisera against serovars 2, 4, 5, 12, 13. The choice of antisera used was performed considering the prevalence of different virulent serotypes described in other european countries. Nineteen *H.parasuis* strains isolated from 2009 were serotyped using both AGID and IHA test, this last by the Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory of Hannover, using antisera against all 15 serotype. The comparison of results between AGID and IHA was made.

In our study serovar 4 was the most prevalent (32,08%) followed by serovar 13 (20,75%) and serovar 5 (15,09%), while 24,53% of the isolates could not be assigned to a serovar (nontypable isolates). The two tests used showed a perfect agreement in 14 cases out of 19. Three isolates be unable to be assigned to a serovar due to cross reactions in IHA test and two more strains were not serotyped due to the disagreement between the two methods used. The combined use of the AGID (screening method) and IHA, as confirmatory method for nontypable strains, could improve the *H. parasuis* serotyping results.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è un batterio Gram- agente eziologico della malattia di Glässer del suino, caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente.

Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento di fattori stressanti e il concomitante sviluppo di patogeni “door opener” come il PRRSV, hanno permesso che *H. parasuis* divenisse un problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari.

Ad oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H. parasuis* con prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, studi di sierotipizzazione eseguiti in diversi Paesi dimostrano che i sierotipi 4, 5 e 13 risultano essere i più frequenti mentre altri come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrano prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Tab. 1).

Tab. 1: Prevalenza dei sierotipi di *H. parasuis* isolati in diverse aree geografiche (Luppi et al., 2010a).

Tab. 1: *H. parasuis* serovars prevalence and geographical origin (Luppi et al., 2010a).

AREA GEOGRAFICA	Sierotipo (%)
Australia ^a	5 (23%), 13 (19%), 4 (13%), 9 (6%), 1 (3%), 2 (3%), 12 (3%), NT* (29%)
Canada ^b	5 (24%), 4 (16%), 13 (11%), 14 (9%), 2 (8%), 12 (7%), NT* (15%)
USA ^c	4 (39%), 3 (8%), 12 (7%), 1 (7%), 2 (4%), 14 (3%), NT* (27%)
Danimarca ^d	5 (36%), 13 (22%), 4 (13%), NT* (15%)
Spagna ^e	5 (18%), 4 (16%), 2 (9%), 13 (8%), 7 (4%), NT* (29%)
Germania ^f	5 (24%), 4 (17%), 2 (5%), 13 (4%), 12 (3%), 7 (2%), NT* (26%)
Cina ^g	4 (24%), 5 (19%), 13 (12%), 14 (7%), 12 (7%), NT* (12%)

(^aBlakall et al., 1996; ^bRapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; ^cOliveira et al., 2003; ^dAngen et al., 2004; ^eRubies et al., 1999; ^fKielstein and Wuthe, 1998; ^gCai et al., 2005; *Non tipizzabili).

Detti 15 sierotipi di *H. parasuis* sono stati ulteriormente suddivisi in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Tab. 2).

Tab. 2: *Virulenza dei sierotipi di H. parasuis su suini SPF (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).*

Tab. 2: *Serovars virulence evaluation in SPF pig (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).*

SIEROTIPO	VIRULENZA
1, 5, 10, 12, 13, 14	Morte entro 96 ore
2, 4, 15	Grave polisierosite e poliartrite alla necropsopia
8	Sintomi clinici e lesioni lievi
3, 6, 7, 9, 11	Assenza di sintomi e lesioni

In condizioni di campo, tuttavia, i quadri clinici ed anatomopatologici provocati da un determinato sierotipo possono subire importanti variazioni. Questo si verifica perché *H. parasuis* può sovrapporsi ad infezioni virali come germe d'irruzione secondaria ovvero essere concomitante ad altre infezioni batteriche o ancora essere presente in un focolaio di malattia con più sierotipi. Queste considerazioni, associate alla diversità antigenica riconosciuta tra i vari sierotipi e all'elevata presenza di ceppi classificati come non tipizzabili, sottolineano l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* sia per studi di prevalenza, sia per la scelta di appropriate misure di controllo della malattia. In questo contesto, soprattutto quando quest'ultimo obiettivo vuole essere raggiunto con l'impiego della vaccinazione è necessario poter confrontare l'omologia tra i ceppi presenti nelle preparazioni vaccinali e quelli circolanti in allevamento. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nel valutare i possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H. parasuis*, considerando che la cross-protezione, seppur con un certo grado di variabilità, è stata dimostrata tra differenti sierotipi (Oliveira and Pijoan, 2004).

Il presente lavoro si pone due principali obiettivi:

- Aggiornamento ed integrazione dei dati di prevalenza dei sierotipi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2010, rispetto ad un precedente lavoro (Luppi et al., 2010a)
- comparazione dei risultati ottenuti con l'impiego dell'emoagglutinazione indiretta (IHA) e dell'immunodiffusione in gel di agar (AGID) applicate ai ceppi isolati nel periodo 2009-2010.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed indagini batteriologiche

Nel periodo 2007-2010, il materiale patologico conferito per accertamenti diagnostici presso la Sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER, è stato sottoposto alle indagini di laboratorio ritenute più opportune sulla base dei quadri anatomopatologici osservati.

In presenza di lesioni riferibili a polmonite, broncopolmonite, pleurite fibrinosa e polisierosite sono stati campionati i polmoni, il liquido pericardico, il liquido cefalorachidiano ed il liquido sinoviale. Queste matrici sono state utilizzate per l'esame batteriologico attraverso la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con Nicotinammide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato ulteriormente arricchito con uno striscio di *Staphylococcus aureus* che, grazie alla sua capacità di produrre fattore V, ha permesso la crescita di quei patogeni NAD-dipendenti come *H. parasuis*.

La successiva incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner ed in termostato a CO₂ per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione lo sviluppo di *H. parasuis* è stato confermato tramite test biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti ed ureasi negative) e morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica al microscopio ottico dopo colorazione di Gram).

Sierotipizzazione di *H. parasuis* mediante AGID ed IHA

I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati tipizzati presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER mediante il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), con l'impiego di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13. La scelta di questi antisieri, acquistati presso il Gallant Custom Laboratory (Canada), è avvenuta sulla base di dati di prevalenza e di patogenicità raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi Paesi (Tab. 1 e 2). Il protocollo impiegato ha previsto le fasi descritte da Luppi et al. nel 2010.

I ceppi isolati a partire dal 2009, sono stati sierotipizzati impiegando sia l'AGID sia una metodica di Emoagglutinazione Indiretta (IHA), come descritto da Turni e Blackall nel 2005. Il test IHA è stato eseguito presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory di Hannover, impiegando gli antisieri nei confronti di tutti i 15 sierotipi di *H. parasuis* conosciuti.

RISULTATI

I 53 ceppi di *H. parasuis* sono stati identificati come sierotipo 4 (32,08%), sierotipo 13 (20,75%), sierotipo 5 (15,09%), sierotipo 2 (5,66%) e sierotipo 12 (1,89%) mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 24,53% (Tabella 3).

Trentadue ceppi di *H. parasuis* sono stati isolati da casi di polisierosite (forma sistemica) con una netta prevalenza dei sierotipi 4 (40,62%) e 13 (21,87%). Nei restanti 21 casi l'esame anatomopatologico ha fatto registrare esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale ed i ceppi appartenenti ai sierotipi 4, 5 e 13 sono risultati egualmente rappresentati (Tabella 3).

L'applicazione combinata dell'AGID e dell'IHA su 19 ceppi di *H. parasuis* nel periodo 2009-2010 ha fornito risultati sovrapponibili in 14 casi su 19. In 5 casi non è stato possibile sierotipizzare correttamente i ceppi in esame a causa di risultati discordanti tra le due metodiche (2/5) e di fenomeni di cross-reazione (3/5). In questi ultimi 3 casi il test IHA ha rilevato più di un sierotipo per ogni ceppo analizzato ottenendo una contemporanea positività rispettivamente ai sierotipi 1 e 15, 2 e 15, 5 e 15. Questi stessi ceppi sono risultati non tipizzabili in AGID (Tabella 4).

Tab. 3: Risultati del test AGID relativi ai ceppi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2010 suddivisi sulla base delle lesioni anatomopatologiche.

Tab. 3: *H. parasuis* serovars prevalence and gross lesions observed.

SIEROTIPO	ANATOMOPATOLOGICO		TOTALE
	Polisierosite fibrinosa	Broncopolmonite	
2	3 (9,38%)	0	3 (5,66%)
4	13 (40,62%)	4 (19,05%)	17 (32,08%)
5	4 (12,5%)	4 (19,05%)	8 (15,09%)
12	0	1 (4,76%)	1 (1,89%)
13	7 (21,87%)	4 (19,05%)	11 (20,75%)
NT*	5 (15,63%)	8 (38,09%)	13 (24,53%)
TOTALE	32	21	53

(*non tipizzabile)

Gli isolamenti batterici concomitanti a *H. parasuis* sono risultati in ordine di frequenza: *P. multocida* (12/53), *S. suis* (5/53), *A. pleuropneumoniae* (3/53), *B. bronchiseptica* (2/53) e *A. pyogenes* (1/53).

Tab. 4: Risultati dei test di sierotipizzazione di *H. parasuis* eseguiti sui ceppi isolati nel biennio 2009-2010.

Tab. 4: Serological typization of *H. parasuis* isolates in the last two years period (2009-2010).

SIEROTIPI		AGID ^b							
		2	4	5	12	13	NT ^c	CR ^d	TOT
IHA ^a	2	2							2
	4		8						8
	5			1					1
	7		2						2
	12				1				1
	13					2			2
	NT ^c								-
	CR ^d						3		3
	TOT	2	10	1	1	2	3	-	19

(^aEmoagglutinazione Indiretta; ^bImmunodiffusione in Gel di Agar; ^cNon tipizzabile; ^dCross-reazione)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'attività di sierotipizzazione ha evidenziato una netta prevalenza dei sierotipi 4 (32,08%), 13 (20,75%) e 5 (15,09%) confermando il dato ottenuto in un precedente lavoro sull'argomento (Luppi et al., 2010a). I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 24,53% di quelli esaminati. Relativamente a quest'ultimo dato non è possibile scindere la reale percentuale dei ceppi non tipizzabili da quella dei ceppi non tipizzabili con gli antisieri adottati, ciononostante risulta essere sovrapponibile a quanto riportato in altri lavori scientifici sull'argomento (Tabella 1).

Valutando i risultati indicati in Tabella 3, che riportano l'associazione tra il sierotipo isolato e le lesioni anatomopatologiche rilevate, si evince una maggior frequenza dei sierotipi 4 e 13 nelle forme sistemiche piuttosto che nei casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (broncopolmonite). Per contro, l'isolamento del sierotipo 5 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite risulta sovrapponibile e i ceppi non tipizzabili sono stati rilevati più frequentemente in associazione alle forme cosiddette non sistemiche. Questa osservazione si trova in contrasto con quanto riportato da Angen et al. nel 2004, che descrive una prevalenza del sierotipo 4 in forme non sistemiche rispetto a quelle di polisierosite. Nello stesso lavoro la maggior parte dei ceppi non tipizzabili è stata isolata prevalentemente da casi con infezione sistemica. Questi risultati conflittuali possono essere dovuti all'elevata variabilità sia genetica sia del grado di virulenza, anche tra ceppi appartenenti allo stesso sierotipo (Blackall et al., 1996).

La comparazione dei risultati ottenuti con l'applicazione dell'AGID e dell'IHA evidenzia una buona concordanza tra le due metodiche. In 14 casi su 19 è stato assegnato lo stesso sierotipo con entrambe le metodiche. In tre casi i risultati sono stati considerati non conformi a causa della positività riscontrata con l'IHA contemporaneamente nei confronti di due sierotipi (1 e 15; 2 e 15; 5 e 15 rispettivamente). L'impiego dell'IHA con l'uso di diluizioni progressive del siero in prove comparative permette, all'interno delle reazioni crociate, di differenziare una reazione propria da una aspecifica (Del Rio et al., 2003). Tuttavia, anche l'impiego di

questa procedura non ha permesso di assegnare correttamente il sierotipo di appartenenza ai tre ceppi in esame ed il risultato ottenuto è stato considerato come causa di fenomeni di cross-reazione.

In due casi sono stati rilevati risultati discordanti tra le metodiche impiegate, dove due ceppi sono stati identificati come sierotipo 4 tramite AGID e come sierotipo 7 con l'impiego dell'IHA. I due ceppi di *H. parasuis* sopraccitati sono stati isolati da polmoni di animali con evidenti quadri di polisierosite, in assenza di altri patogeni batterici. Sulla base della classificazione della patogenicità di Kielstein and Rapp-Gabrielson del 1992 (Tab. 2) il sierotipo 7 è considerato non patogeno mentre, come già accennato, il sierotipo 4 è riconosciuto come agente di polisierosite nel suino. Relativamente a queste valutazioni si ritiene che il risultato ottenuto tramite AGID sia da considerarsi più attendibile rispetto all'esito fornito dall'IHA. I risultati ottenuti dalla comparazione delle due metodiche necessitano di ulteriori approfondimenti impiegando un numero maggiore di ceppi. Sebbene l'IHA venga descritta come metodica in grado di avere un minor numero di ceppi non tipizzabili rispetto all'AGID, risulta essere estremamente indagiosa (Cai et al., 2005; Tadjine et al., 2004). Pertanto, da un punto di vista metodologico la sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* può avvalersi dell'impiego in serie di entrambe le metodiche descritte. L'adozione dell'AGID come test di screening e l'impiego dall'IHA come test di conferma nei casi di mancata tipizzazione con l'AGID, può rappresentare un buon compromesso in grado di ridurre i tempi di risposta ed i costi di realizzazione, pur mantenendo una elevata percentuale di ceppi tipizzati.

BIBLIOGRAFIA

- Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103, 255-258.
1. Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J. (1996). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust. Vet. J.* 73, 93-95.
 2. Cai X., Chen H., Blackall P.J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M. (2005). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Veterinary Microbiology* 111, 231-236.
 3. Del Rio M.L., Gutiérrez C.B., and Rodriguez Ferri E.F. (2003). Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Test for Serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 880-882.
 4. Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J. (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* 30, 826-865.
 5. Kielstein P. and Wuthe H-H. (1998). Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and related bacteria from the organs of pigs in Schleswig-Holstein. *Tierärztl Umschau* 53, 250-258.
 6. Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. (2010a). Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici. *Atti XXXVI Meeting Annuale SIPAS. Montichiari 25-26 Marzo 2010*.
 7. Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M., Martelli P. (2010b). Serological Characterisation of *Haemophilus parasuis* strains in Italy. Elisabeth grosse Beilage & Thomas Blaha – Field Station of Epidemiology – University of Veterinary Medicine – Hannover, Hannover: 116- 116, In: 2nd European Symposium on Porcine Health Management. 26-28 Maggio 2010, Hannover.
 8. Mittal K.R., Higgins R., and Lariviera S. (1983). Determination of Antigenic Specificity and Relationship Among *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotypes by an Indirect Hemagglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 17, 787-789.
 9. Mittal K.R., Higgins R., and Lariviera S. (1982). Evaluation of slide agglutination and

- ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus parasuis*. J. Clin. Microbiol. 15, 1019-1023.
10. Oliveira S. (2007). *Haemophilus parasuis* diagnostics. J. Swine Health Prod. 15, 99-103.
11. Oliveira S., Blackall P. J., Pijoan C. (2003). Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. Am. J. Vet. Res. 64, 435-442.
12. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology 99, 1-12.
13. Olvera A., Ballester M., Nofrarias M., Sibila M., Aragon V. (2009). Differences in Phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. Vet. Res. 40, 24.
14. Rafiee M., Blackall P.J. (2000). Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet. J. 78, 172-174.
15. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res. 53, 659-664.
16. Rapp-Gabrielson V.J., Oliveira S., Pijoan C. (2006). *Haemophilus parasuis* in "Diseases of Swine", Blackwell Publishing. 9th edition, 681-690.
17. Raßbach A. (1992). Biochemical and serological typing of *Haemophilus parasuis*. Monatsh Veterinaarmed 47, 637-641.
18. Rúbies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C., Espuna E. (1999). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol. 66, 245-248.
19. Solano G.I., Bautista E., Molitor T.W., Segales J., Pijoan C. (1998). Effect of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection on the Clearance of *Haemophilus parasuis* by Porcine Alveolar Macrophages. Can. J. Vet. Res. 62, 251-256.
20. Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottscalk M. (2004). Development of a New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. Journal of Clinical Microbiology 422, 839-840.
21. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology 106, 145-151.