

DINAMICA DELL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN 4 ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI A CICLO CHIUSO

DYNAMICS OF Mycoplasma.hyopneumoniae INFECTION IN 4 SWINE ITALIAN FARROW TO FINISH HERDS

GIACOMINI E. ¹, FERRO P. ², NASSUATO C. ¹, SALOGNI C. ¹
ALBORALI L. ¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, ²Elanco Italia

Parole chiave: Mycoplasma Hyopneumoniae, tamponi nasali, nested-PCR, suino
Key words: Mycoplasma Hyopneumoniae, nasal swabs, nested-PCR, pig

Riassunto. La dinamica e la diffusione di *M. hyopneumoniae* può assumere caratteri diverse in funzione della tipologia d'allevamento, della gestione e della corretta applicazione delle principali misure di profilassi igienico sanitaria.

Lo studio è stato condotto in 4 allevamenti a ciclo chiuso in cui non era stata utilizzata la vaccinazione verso *M.hyopneumoniae* negli ultimi 24 mesi. E' stato applicato un protocollo di campionamento che ha previsto il prelievo di campioni di sangue e di tamponi nasali in 10 categorie di età. In tutti i 4 allevamenti è stata dimostrata una attiva circolazione dell' infezione da *M.hyopneumoniae* e con caratteristiche di diffusione differenti a seconda dell'allevamento e dei gruppi di animali. I suini appartenenti alle categorie di età comprese tra 4 e 16 settimane sono risultati siero negativi. La siero conversione è stata dimostrata nei suini appartenenti alle categorie di 16 e 24 settimane mentre la presenza di *M.hyopneumoniae* nei tamponi nasali è stata osservata in suini di 12 e 16 settimane. A fronte della comparsa di anticorpi in gruppi di età di 16 e 24 settimane rispettivamente negli allevamenti 2,4 e 1,3 la presenza di *M.hyopneumoniae* è stata messa in evidenza più precocemente in tamponi nasali di suini di 12 settimane negli allevamenti 3e 4, di 16 e 20 settimane nelle aziende 2 e 1.

L' utilizzo di n PCR su tamponi nasali in animali vivi in combinazione con l'esame sierologico ha consentito di conoscere meglio la dinamica dell' infezione nei 4 allevamenti. A fronte di una positività sierologica tardiva l' infezione da *M. hyopneumoniae* è risultata essere presente nelle fasi di svezzamento e magronaggio e gruppi di suinetti di differenti età e dello stesso allevamento si sono comportati in maniera diversa.

Abstract. The dynamic and the diffusion of the *M. hyopneumoniae* can assume the different aspects depending on the type of breeding, on the management end on the correct application of the sanitary levels.

The study has been conducted in 4 herds (close cycle) where vaccine were not used for *M. hyopneumoniae* in the last 24 months. Protocol of blood sampling and nasal swabs has been applied in 10 age groups. In all 4 herds an active circulation of the *M. hyopneumoniae* infection was demonstrated and with different diffusion characteristics depending on the farms and of the animals groups. The swine belonging to the age groups between 4 and 16 weeks resulted negative serum. The serum conversion was demonstrated in swine belonging to groups of 16-24 weeks while the presence of *M. hyopneumoniae* in the nasal swabs was observed in pigs of 12 an 16 weeks. With the appearance of antibodies in age groups of 16-24 weeks respectively in the herds 2,4 and 1,3 the presence of *M. hyopneumoniae* was revealed earlier in nasal swabs of swine of 12 weeks in the herds 3 and 4 of 16 and 20 weeks in the farms 2 and 1.

The use of n PCR an nasal swabs in live animals in combination with serum tests permitted better understanding the dynamics of the infection in the herds 4. in front of a delayed positive serum the *M. hyopneumoniae* infection is present in the phase of weaning and post-weaning and swine groups of different ages of the same herd behaved in a different way.

INTRODUZIONE

La conoscenza della dinamica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* in un allevamento rappresenta uno strumento importante e strategico al fine di adottare specifiche misure di biosicurezza e dell'impostazione di programmi di trattamenti antibatterici e vaccinali.

M. Hyopneumoniae è agente eziologico responsabile della polmonite enzootica suina, patologia altamente diffusa e con importanti ricadute sul bilancio economico dell'azienda. Questo microrganismo è considerato uno "door opener" rispetto ad altri patogeni respiratori di infezione secondaria (Cipriani et al., 1994) e viene spesso coinvolto anche nel complesso della sindrome post svezzamento associato a PCV2 (Thacker 2006, Opriessnig et al., 2004).

Le patologie respiratorie sono fra le principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino e il ruolo di *M. hyopneumoniae* si è consolidato negli ultimi anni (Sorensen et al., 2006). I siti elettivi di replicazione di questo patogeno sono la mucosa tracheale, bronchiale e bronchiolare e la colonizzazione dell'epitelio respiratorio ciliato risulta essere un pre requisito al fine dello scatenarsi della patologia (Blanchard et al., 1992, Kwon et al., 2002).

Numerosi sono i fattori coinvolti nella trasmissione del patogeno in allevamento e comprendono la tipologia dell'allevamento, la condizione immunitaria delle madri, il livello di trasferimento degli anticorpi dalla scrofa al suinetto, la gestione e il management aziendale. *M. hyopneumoniae* è molto diffuso negli allevamenti suini e la sua prevalenza media fra animali dello stessa azienda è considerata molto variabile e, a seconda della realtà, si attesta fra il 30 e l'80 % (Sibila et al., 2004, Meyns et al., 2010, Fraile et al., 2010, Grosse Belaige et al., 2009, Hansen et al., 2010, Ji et al., 2009)

Queste considerazioni hanno contribuito al successo della vaccinazione verso *M. hyopneumoniae* che negli ultimi anni è diventata una pratica comune nelle maggior parte delle realtà suinicole del mondo (Maes et al., 2008).

La conferma della presenza di *M. hyopneumoniae* in un allevamento viene effettuata normalmente attraverso gli esami sierologici e indagini di biologia molecolare atte a mettere in evidenza il DNA del microorganismo in campioni di polmone prelevati al macello o in soggetti deceduti e sottoposti ad esame anatomico patologico.

ELISA è il test sierologico più comunemente usato per la ricerca di anticorpi verso *M. hyopneumoniae* e i risultati possono essere espressi in valori OD o S/P. Al fine di valutare la dinamica dell'infezione è importante considerare la siero prevalenza e l'andamento nel tempo dei valori SP nelle differenti categorie di età. I modelli di campionamento longitudinale sono in grado di fornire indicazioni specifiche per i singoli animali anche se la complessità organizzativa e la loro durata nel tempo ne condizionano l'utilizzo nella routine diagnostica.

L'isolamento di *M. hyopneumoniae* tramite coltura risulta essere la metodica "gold standard", ma, considerate le difficoltà di crescita in vitro, le metodiche più utilizzate sono la n PCR e la RT PCR (Artiushin et al., 1993, Sibila et al., 2009).

La tipologia e la metodica di campionamento sono molto importanti al fine dei risultati che ci si possono attendere. I migliori risultati si ottengono utilizzando il lavaggio tracheo bronchiale e tamponi tracheo-bronchiali mentre con il prelievo di tamponi nasali si riducono le possibilità di evidenziare l'antigene. La n PCR è in grado di fornire risultati ottimi se applicata a lavaggi broncoalveolari (BALS) e tamponi bronchiali. (Fablet et al., 2009). Si considera che infettando sperimentalmente suini SPF con i lavaggi e tamponi tracheo bronchiali si è in grado di evidenziare una positività rispettivamente del 70 % e del 67 % dei suini mentre con i tamponi nasali si può arrivare ad una positività del 13%.(Marois et al., 2007).

L'abbinamento della sierologia su modelli di campionamento cross sectional alla n PCR su tamponi nasali rappresenta il protocollo applicabile in allevamento in grado di fornire informazioni diagnostiche e di dinamica dell'infezione nei diversi gruppi e categorie di età (Calsamiglia et al.,1999) Il ritrovamento del microorganismo nei tamponi nasali indica con maggior accuratezza il momento dell'infezione mentre la sierologia evidenzia un contatto pregresso con l'antigene avvenuto in tempi variabili da 4 a 8 settimane prima (Mattson et al , 1995 , Calsamiglia et al . ,1999)

Numerosi sono gli studi che hanno correlato l'infezione da *M.hypopneumoniae* con fattori ambientali e gestionali. E noto che un'elevata rimonta , le provenienze multiple di soggetti destinati allo svezzamento o all' ingrasso , il flusso continuo, l'elevata densità di animali favoriscono la diffusione dell'infezione mentre la pratica del tutto pieno/tutto vuoto o la produzione in sistemi a tre siti sono in grado di contenere l'infezione

L'obiettivo di questo lavoro è quello di determinare la dinamica dell'infezione da *M.hypopneumoniae* in 4 allevamenti a ciclo chiuso in cui da almeno 2 anni non era praticata la vaccinazione attraverso l'applicazione di un protocollo di campionamento di sangue su modello cross sectional e di tamponi nasali esaminanti con n PCR.

MATERIALI E METODI

Selezione degli allevamenti

Sono state selezionate 4 aziende a ciclo chiuso che da almeno 24 mesi non utilizzavano vaccini per *Mycoplasma Hypopneumoniae*. L'azienda n 1 aveva una consistenza di circa 2000 scrofe con svezzamento esterno, la n 2 di 1000, la 3 aveva una scrofaia composta da 700 capi e infine la 4 da 500 scrofe.

Di seguito vengono riportati i trattamenti antibatterici utilizzati nelle aziende

Azienda 1: azienda che utilizza Tiamulina durante lo svezzamento e magronaggio 3 giorni a settimana

Azienda 2 : azienda che utilizza nei sottoscrofa amoxicillina e colistina nel mangime

Azienda 3 : azienda che utilizza nei sottoscrofa amoxicillina e colistina nel mangime

Azienda 4 : azienda con sito 2 esterno che utilizza Tilosina e sulfamidico nei primi 60 giorni di vita dei suini .

Protocollo di campionamento

In ogni azienda sono stati selezionati 10 gruppi di suini di età diverse e al loro interno sono stati scelti casualmente 10 soggetti per categoria appartenenti ad almeno 3 box.

Il protocollo utilizzato è stato il medesimo per ciascuna azienda e prevedeva quanto segue :

- 1 settimana di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 4 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 8 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 12 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 16 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 20 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 24 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 28 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 32 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 36 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali

In questo modo in tutti i 4 allevamenti sono stati prelevati 100 campioni di sangue e 50 tamponi nasali.

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare in provette senza anticoagulante

I tamponi nasali sono stati eseguiti utilizzando un tampone cotonato monouso per ogni narice posto in una provetta contenente liquido di trasporto.

Tali campioni sono stati identificati singolarmente, trasportati a temperatura di refrigerazione, registrati e processati

Indagini di laboratorio

ELISA

Il sangue è stato centrifugato a 1500 giri x 3 minuti e il siero ottenuto è stato stoccato a -20° per essere esaminato contemporaneamente. La ricerca degli anticorpi verso *M. hyopneumoniae* è stata effettuata mediante test ELISA blocking (R. F. Ross 1999). HerdCeck *M. hyopneumoniae*, IDEXX Laboratories Secondo le indicazioni sono stati riconosciuti positivi i soggetti con valore SP > 0,4 negativi quelli < a 0,3, e sospetti quelli fra 0,3 e 0,4.

Oltre alla determinazione della sieropositività e della siero prevalenza è stata effettuata anche una valutazione dei valori SP medi nelle diverse categorie di età. In questa elaborazione sono stati compresi tutti i valori SP indipendentemente dalla soglia di positività.

n-PCR

I tamponi nasali sono stati preparati utilizzando per l'estrazione una sospensione ottenuta ponendo il tampone in PBS sterile. La valutazione della contaminazione durante le procedure di estrazione sono state testate inserendo un controllo negativo costituito da PBS in ogni gruppo di campioni processati L'identificazione del DNA di *M. hyopneumoniae* è stata effettuata mediante Nested PCR modificata usando primers e condizioni descritte precedentemente (Calsamiglia et al 1999 Sibila et al., 2004).

I tamponi nasali sono stati analizzati singolarmente e classificati in n PCR positivi o negativi.

Analisi statistica

Sono stati stimati i valori di siero prevalenza, del titolo medio anticorpale e della prevalenza di infezione con i rispettivi intervalli di confidenza al 95% per ciascuna azienda e per categoria di età entro azienda. Inoltre sono stati stimati i valori di siero prevalenza e di prevalenza di infezione per ciascuna categoria di età rispettivamente mediante un modello lineare e un modello logistico a effetti misti con effetto random l'azienda.

RISULTATI

ELISA

I risultati delle indagini ELISA effettuate in tutti i 4 allevamenti espressi in termini di siero prevalenza per categoria e azienda sono riportati nella tabella 1. I risultati sono espressi come numero dei positivi e negativi con la relativa percentuale di prevalenza e indice di confidenza del 95%.

TABELLA 1: *siero prevalenza per azienda e categoria*
TABLE 1: *Herd and category seroprevalence*

<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Sieroprevalenza</i>	<i>IC95%</i>
1	1	0	10	0	0 – 30,85
1	4	0	10	0	0 – 30,85
1	8	0	10	0	0 – 30,85
1	12	0	10	0	0 – 30,85
1	20	0	10	0	0 – 30,85
1	24	1	9	10	0,25 – 44,5
1	28	1	9	10	0,25 – 44,5
1	32	3	7	30	6,67 – 65,25
1	36	2	8	20	2,52 – 55,61
2	1	0	10	0	0 – 30,85
2	4	0	10	0	0 – 30,85
2	8	0	10	0	0 – 30,85
2	12	0	10	0	0 – 30,85
2	16	1	9	10	0,25 – 44,5
2	20	0	10	0	0 – 30,85
2	24	8	2	80	44,39 – 97,48
2	28	4	5	44,44	13,7 – 78,8
2	32	8	2	80	44,39 – 97,48
2	36	9	1	90	55,5 – 99,75
3	1	0	10	0	0 – 30,85
3	4	0	10	0	0 – 30,85
3	8	0	10	0	0 – 30,85
3	12	0	10	0	0 – 30,85
3	16	0	10	0	0 – 30,85
3	20	0	10	0	0 – 30,85
3	24	5	5	50	18,71 – 81,29
3	28	1	9	10	0,25 – 44,5
3	32	0	10	0	0 – 30,85
3	36	2	8	20	2,52 – 55,61
4	1	1	9	10	0,25 – 44,5
4	4	0	10	0	0 – 30,85
4	8	0	10	0	0 – 30,85
4	12	0	10	0	0 – 30,85
4	16	2	8	20	2,52 – 55,61
4	20	4	6	40	12,16 – 73,76
4	24	6	4	60	26,24 – 97,84
4	28	7	3	70	34,75 – 93,33
4	32	4	6	40	12,16 – 73,76
4	36	5	5	50	18,71 – 81,29

La siero prevalenza e il relativo intervallo di confidenza del 95% nelle diverse aziende è riportata nella tabella 2

TABELLA 2: siero prevalenza per azienda

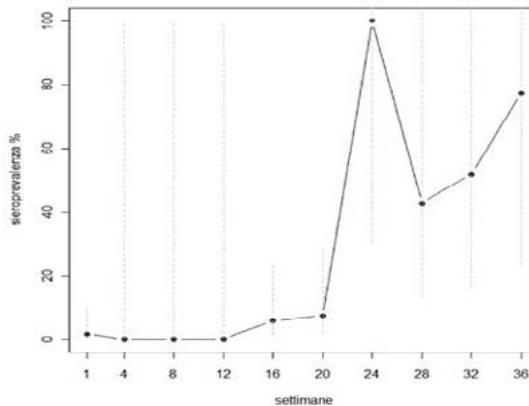
TABLE 2: herd seroprevalence

<i>Azienda</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Sieroprevalenza</i>	<i>IC95%</i>
1	7	83	7,78	3,18 – 15,37
2	30	69	30,3	21,47 – 40,35
3	8	92	8	3,52 – 15,16
4	29	71	29	20,36 – 38,93

Nel Grafico 1 è riportato l'andamento della siero prevalenza in relazione esclusivamente alla diversa categoria di età degli animali.

GRAFICO 1: siero prevalenza per categoria stimata mediante modello a effetti misti con fattore random d'azienda.

GRAPH 1: seroprevalence category estimated by mixed effects model with random factor for herd



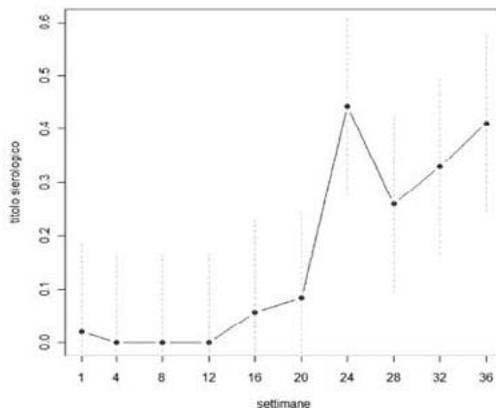
I risultati delle indagini ELISA espressi in termini di valori SP sono riportati nella Tabella 3 e Grafico 2

TABELLA 3: valori stimati del SP mediante modello a effetti misti con effetto random l'azienda

TABLE 3: SP estimated values using mixed effects model with random factor for farm

<i>Settimana</i>	<i>Valore medio SP</i>	<i>IC95%</i>
1	0,02	-0,145 – 0,185
4	0	-0,165 – 0,165
8	0	-0,165 – 0,165
12	0	-0,165 – 0,165
16	0,05618	-0,12 – 0,233
20	0,0825	-0,082 – 0,247
24	0,4425	0,278 – 0,607
28	0,25939	0,094 – 0,425
32	0,33	0,165 – 0,495
36	0,41	0,245 – 0,575

GRAFICO 2: andamento del valore SP per categoria
GRAPH 2: SP performance in different category



n PCR

Nella tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti esaminando i tamponi nasali mediante n PCR mantenendo la suddivisione per azienda e per categorie di età degli animali. I risultati sono espressi come numero dei positivi e negativi con la relativa percentuale di prevalenza e intervallo di confidenza del 95%.

TABELLA 4: prevalenza d'infezione per azienda e categoria
TABLE 4: herd and category infection prevalence

<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Prevalenza infezione%</i>	<i>IC95%</i>
1	1	0	5	0	0 - 52,18
1	4	0	5	0	0 - 52,18
1	8	0	5	0	0 - 52,18
1	12	0	5	0	0 - 52,18
1	20	1	4	20	0,51 - 71,64
1	24	1	4	20	0,51 - 71,64
1	28	1	4	20	0,51 - 71,64
1	32	1	4	20	0,51 - 71,64
1	36	1	4	20	0,51 - 71,64
2	1	0	5	0	0 - 52,18
2	4	0	5	0	0 - 52,18
2	8	0	5	0	0 - 52,18
2	12	0	5	0	0 - 52,18
2	16	1	4	20	0,51 - 71,64
2	20	1	4	20	0,51 - 71,64

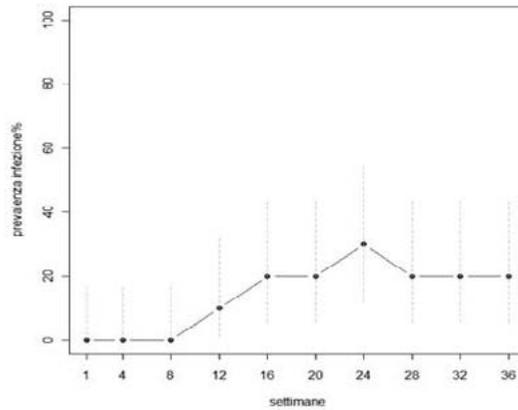
<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Prevalenza infezione%</i>	<i>IC95%</i>
2	24	2	3	40	5,27 - 85,34
2	28	1	4	20	0,51 - 71,64
2	32	1	4	20	0,51 - 71,64
2	36	1	4	20	0,51 - 71,64
3	1	0	5	0	0 - 52,18
3	4	0	5	0	0 - 52,18
3	8	0	5	0	0 - 52,18
3	12	1	4	20	0,51 - 71,64
3	16	1	4	20	0,51 - 71,64
3	20	1	4	20	0,51 - 71,64
3	24	1	4	20	0,51 - 71,64
3	28	1	4	20	0,51 - 71,64
3	32	1	4	20	0,51 - 71,64
3	36	1	4	20	0,51 - 71,64
4	1	0	5	0	0 - 52,18
4	4	0	5	0	0 - 52,18
4	8	0	5	0	0 - 52,18
4	12	1	4	20	0,51 - 71,64
4	16	2	3	40	5,27 - 85,34
4	20	1	4	20	0,51 - 71,64
4	24	2	3	40	5,27 - 85,34
4	28	1	4	20	0,51 - 71,64
4	32	1	4	20	0,51 - 71,64
4	36	1	4	20	0,51 - 71,64

La prevalenza d'infezione per allevamento è riportata nella tabella 5. Nel Grafico 3 è riportata la prevalenza per categoria

TABELLA 5 *prevalenza dell'infezione per azienda*
TABLE 5 *herd infection prevalence*

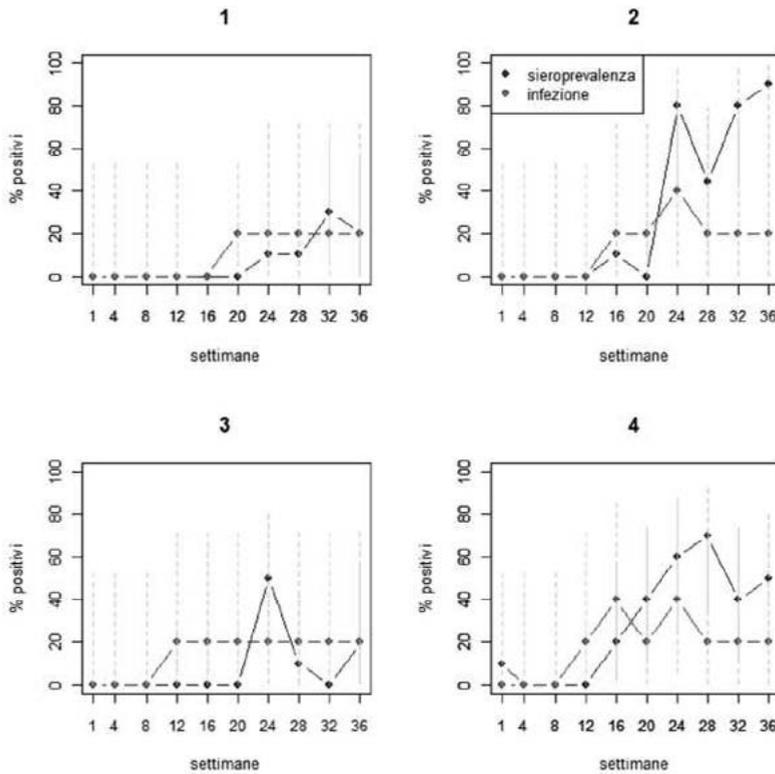
azienda	negativi	positivi	prev	low	up
1	45	5	10	3,33	21,81
2	43	7	14	5,82	26,74
3	43	7	14	5,82	26,74
4	41	9	18	8,58	31,44

FIGURA 3: *prevalenza infezione per categoria*
FIGURE 3: *category infection prevalence*



Nel Grafico 4 sono riportati i risultati ottenuti per ciascuna azienda confrontando la siero prevalenza e l'infezione nelle diverse categorie di animali

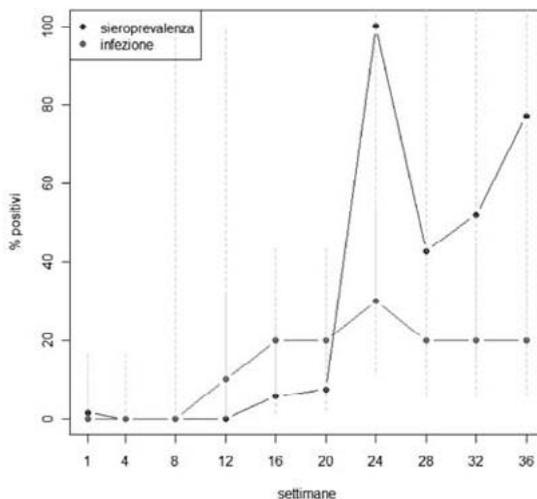
FIGURA 4: *confronto per ciascuna azienda fra l'infezione e la sieroprevalenza*
FIGURE 4: *infection and seroprevalence in each farm*



Nel grafico 5, sono riportati la percentuale di positivi in n PCR e la siero prevalenza rispetto all'età degli animali appartenenti alle quattro aziende con i rispettivi intervalli di confidenza al 95%.

FIGURA 5: confronto fra sieroprevalenza e infezione per età degli animali.

FIGURE 5: comparison between seroprevalence and infection for age of animals



DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica evidenziano come la siero conversione nelle 4 aziende sia rilevabile nelle categorie di età superiore alle 24 settimane. In tutti gli allevamenti la siero prevalenza è risultata nulla nelle categorie di età comprese tra la 4 e la 16. Gli anticorpi di origine materna sono stati rilevati solo nell'allevamento 4 e nella categoria dei suinetti della prima settimana di vita. Nell'azienda 4 la positività sierologica è comparsa più precocemente nel gruppo degli animali di 16 settimane di vita e la siero prevalenza si è mantenuta elevata oltre il 40% a partire dalla 20 settimana. Nell'azienda 2 è stato evidenziato un unico soggetto positivo nella categoria delle 16 settimane anche se la siero conversione è stata apprezzata nel gruppo delle 24 settimane.

I risultati della n PCR evidenziano nel loro insieme come l'infezione da *M.hyopneumoniae* presente nelle categorie di età superiore alle 20 settimane in tutte le aziende e in uno o due soggetti su cinque per categoria. La variabilità riguarda soprattutto l'inizio della circolazione che è stata dimostrata nel gruppo di suini di 12 settimane nell'azienda 3 e 4 e nei suini di 16 settimane nell'azienda 2. Se si considera la positività in tamponi nasali si può osservare che la prevalenza dell'infezione risulta superiore (2 soggetti su 5) nelle aziende 2 e 4 rispettivamente nelle categorie di 24 settimane nella prima azienda e di 16 e 24 settimane nella seconda.

La valutazione dei risultati delle indagini sierologiche e di n PCR per azienda consente di osservare che la circolazione più evidente e precoce avviene nell'allevamento 4. In questa azienda le n PCR cominciano ad essere positive nei suini di 12 settimane e dei 50 tamponi nasali esaminati 9 sono risultati positivi. Anche la siero conversione avviene nel gruppo di 16 settimane. Considerazione opposta può essere fatta per allevamento 1. Il 10% dei tamponi nasali è risultato positivo e il gruppo di suini di 20 settimane è risultato essere quello più precocemente infetto. La siero conversione è stata evidenziata nel gruppo di 24 settimane.

Nell' allevamento 3 nonostante le siero conversione evidenziata sempre a 24 settimane, la prevalenza di *M.hyopneumoniae* è risultata del 14 % e la circolazione precoce essendo stata evidenziata nel gruppo di 12 settimane. La positività dei tamponi nasali nel gruppo di 16 settimane suggerisce che nell'allevamento 2 la circolazione ha inizio precocemente ma è rimasta bassa fino alle 24 settimane dove aumenta per poi rimanere costante fino alle 36 settimane .

Tutti i 4 allevamenti hanno dimostrato una attiva circolazione dell' infezione da *M.hyopneumoniae* e con caratteristiche di diffusione diverse anche all'interno dei differenti gruppi di età . Questo aspetto difficilmente può essere evidenziato con l'utilizzo della sola sierologia soprattutto se applicata su un modello di campionamento cross sectional. L' utilizzo dell' esame sierologico in combinazione con n PCR può rappresentare un modello in grado di definire la diffusione dell' infezione nelle diverse realtà d' allevamento. L' applicazione in campo di questo protocollo deve tener conto che il prelievo in suini vivi deve essere di facile esecuzione, rapido, poco costoso e numericamente contenuto ma in grado di portare a dati utili per migliorare ed intensificare le misure di controllo in allevamento. L' utilizzo del tampone nasale rispetta tali criteri anche se è riconosciuto che il numero di microrganismi presente nelle cavità nasali è basso e che l'eliminazione avviene in maniera intermittente (*Pietres e Pijoan 2006*). Comunque l' utilizzo di n PCR in tamponi nasali per la diagnosi in vita di un infezione naturale è riconosciuta valida in funzione del fatto che esiste un relazione tra la presenza di *M. hyopneumoniae* nelle cavità nasali e nei bronchi di polmoni con lesioni da polmonite enzootica.

(*Sibilia et al., 2004*). Tuttavia questa procedura è considerata più indicata per il monitoraggio dell' infezione in allevamento piuttosto che per valutare il singolo soggetto (*Otagiri et al., 2005*). L' applicazione di n PCR su lavaggio bronco alveolare o su tamponi bronchiali consentirebbe di determinare con maggior precisione il momento in cui un animale vivo è infetto (*Marois et al., 2008*).

CONCLUSIONE

Precedenti studi hanno dimostrato che la dinamica dell' infezione da *M. hyopneumoniae* in allevamento sia difficilmente riconducibile ad un preciso modello ma sia spesso eterogenea e diversa a seconda della tipologia aziendale e della gestione dei gruppi di animali .

I risultati di questa indagine indicano che , pur avendo considerato 4 allevamenti della stessa tipologia e che non utilizzavano la vaccinazione da almeno 24 mesi, l' infezione di *M. hyopneumoniae* può avere una dinamica specifica e diversa a seconda delle caratteristiche delle aziende. La determinazione della dinamica in un allevamento richiede l' applicazione di protocolli diagnostici che comprendano oltre all' esame sierologico anche la n PCR su tamponi nasali di suini appartenenti a categorie ed età diverse. La conoscenza del momento, della fase di allevamento e della variabilità dell' infezione in gruppi dello stesso allevamento consente di affrontare il problema *M. hyopneumoniae* in maniera mirata e capire lo spazio temporale in cui gli animali si infettano al fine di stilare un corretto e puntuale protocollo vaccinale e/o di trattamenti antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Artushin S, Stipkovits L, Minion FC. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Moll Cell Probes. 1993;7:381-385
- 2) Blanchard, B., Vena, M., Cavalier, A., Lannic, J., Gouranton, J., Kobisch, M., Le-Lannic, J., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30, 329-341
- 3) Calsamiglia; Pijoan C., Trigo A., 1999. Application of a nested PCR assay to detect *M. hyopneumoniae* from nasal swabs. Journal Veterinary Diagnostic Investigation 11: 246-251

- 4) Cipriani, A., T. A. Cruz, and M. De La Garza, 1994: *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. 25, 235–239
- 5) Erlandson, K. R., R. B. Evans, B. J. Thacker, M. W. Wegner, E. L. Thacker, 2005: Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Swine Health Prod. 13, 198–203
- 6) Fablet C., Marois C., Kobisch M., Madec F., Rose N. Estimation of sensitivity of four sampling methods for *M.hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. Veterinary Microbiology 2010. 238-245
- 7) Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarias, M. and Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs, Veterinary Journal, 184, 326-333
- 8) Grosse Beilage, E., Rohde, N. and Krieter, J., 2009. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, Preventive Veterinary Medicine, 88, 255-263
- 9) Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M. and Nielsen, O.L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark, Journal of Comparative Pathology, 143, 120–131
- 10) Kwon et al., 2002 D. Kwon, C. Choi and C. Chae, Chronologic localization of *M.hyopneumoniae* in experimentally infected pigs, *Veterinary Pathology* **39** (2002), pp. 584–587.
- 11) Ji, X.Q., Duan, Z.Q., Hua, Z.D. and Yu, D.B., 2009. Serological investigation and analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in miniature pigs, Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 9, 92–93 (in Chinese)
- 12) Maes et al., 2008 D. Maes, J. Segales, T. Meyns, M. Sibila, M. Pieters and F. Haesebrouck, Control of *M.hyopneumoniae* infections in pigs, Veterinary Microbiology 126 (2008), pp. 297–309
- 13) Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V., 2007. Isolation of *M.hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. Vet. Microbiol. 120, 96–104.
- 14) Mattson JG., Bergstrom K., Wallgren P., Johansson KE., 1995. Detection of *M. hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16 SrRNA gene. Journal Clinical Microbiology 33 893-897
- 15) Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F. and Maes, D., 2010. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter, Veterinary Journal, 2010 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 16) Opriessnig et al., 2004 T. Opriessnig, E.L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X.J. Meng and P.G. Halbur, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *M.hyopneumoniae* and porcine Circovirus type 2, Veterinary Pathology 41 (2004), pp. 624–640
- 17) Otagiri Y., Asai T., Okada M., Uto T., Yazawa S., Hirai H., Shibata I., Sato S., 2005. Detection of *M. hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. The Journal of Veterinary Medicine Science 67, 801-805
- 18) Pieters M., Pijoan C., 2006. Detection of *M. hyopneumoniae* e DNA in experimentally infected pigs. In Proceedings of the 19 International Pig Veterinary Society, Copenhagen Denmark p. 209
- 19) R. F. Ross. 1999. *Mycoplasma*. In : Diseases of Swine 8 Edition. B. E. Straw, S. D’Allaire, W.L. Mengeling, D.J.Taylor, Eds., ISU Press, Ames, IA, pp.455-509

- 20) Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A. and Jensen, J.C., 2004. Dynamics of *M.hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems, Canadian Journal of Veterinary Research, 68, 12–18
- 21) Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segale' s, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *M.hyopneumoniae* infection. Vet. J. 181, 221–231
- 22) Sørensen, V., Jorsal, S.E., Mousing, J., 2006. Diseases of the respiratory tract. In: Leman, A.D., Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine, ninth ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 149–177
- 23) Thacher EL, Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Swine Health Prod. 2004; 12(5) : 252-254.
- 24) Thacker, E., 2006. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. 9th ed. Blacwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 701–71.