

STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS IN SUINETTI SOTTOSCRUOLA IN DUE ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO

STUDY ON THE TRANSMISSION OF MYCOPLASMA HYORHINIS IN SUCKLING PIGLETS IN TWO FARROW-TO-FINISH FARMS

USTULIN M.¹, CATANIA S.², GOBBO F.³, TARGHETTA C.¹, PIERASCO A.¹, TOSON M.⁴, VIO D.¹

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

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Verona, Verona

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (PD)

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Epidemiologia Veterinaria, Legnaro (PD)

Parole chiave: *Mycoplasma hyorhinis*, suinetti

Keywords: *Mycoplasma hyorhinis*, piglets

Riassunto: Considerato in passato dalla maggior parte dei ricercatori come semplice commensale, negli ultimi anni si sta rivalutando il ruolo patogeno di *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*). Questo batterio è stato isolato in corso di patologie quali polisierositi e artriti e si ritiene possa avere un ruolo anche nello sviluppo di patologia respiratoria nell'ambito del Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Nel corso del presente studio è stata valutata la presenza e la diffusione di *M. hyorhinis* a livello delle cavità nasali di scrofe e suinetti nel corso del primo mese di vita dei suinetti in due allevamenti a ciclo chiuso.

È stata osservata una diffusione precoce del batterio, con positività di circa il 90% tra suinetti di 30 giorni di vita, anche a fronte di una limitata e discontinua positività nelle scrofe.

Abstract: For a long time regarded as a possible commensal, the pathogenic role of *Mycoplasma hyorhinis* is now under re-evaluation. This bacterium has been isolated in cases of arthritis and polyserositis and seems to play an important role in PRDC (Porcine Respiratory Disease Complex).

During the present study, presence and diffusion of *M. hyorhinis* in nasal cavity of sows and piglets during the first month of life were evaluated in two farrow-to finish farms.

An early diffusion of the bacteria was observed, with nearly 90% of piglets positive by 30 days of age, although only a few sows resulted discontinuously positive.

INTRODUZIONE

Descritto per la prima volta nel 1955, *M. hyorhinis* viene frequentemente isolato dal tratto respiratorio superiore dei suini, in particolare dalle cavità nasali, dove aderisce alle cellule ciliate dell'epitelio. Seppur comunemente considerato un germe commensale delle prime vie aeree, *M. hyorhinis* è in grado di diffondere, attraverso meccanismi non ancora compiutamente descritti, in vari organi e causare polisierositi e artriti nei suini in svezzamento e magronaggio e artriti nei suini all'ingrasso.

I risultati degli studi eseguiti fino ad oggi hanno messo in evidenza che *M. hyorhinis* viene trasmesso dalla scrofa ai suinetti lattanti durante le prime settimane di vita, e tra suinetti nelle fasi di allevamento successive (Kobisch and Friis 1996). Ad oggi non sono stati condotti studi specifici in merito all'epidemiologia di questo batterio e la maggior parte delle ricerche sono state condotte negli anni '70-'80, agli albori dei sistemi di allevamento industriale e in

situazioni di pressione infettiva nettamente diversa da ora e, per la maggior parte, in suini da ingrasso.

Il ruolo patogeno di *M. hyorhinis* è stato messo in discussione negli ultimi anni; attualmente, in ragione dell'aumento degli isolamenti di questo germe in casi di polisierosite e di malattia respiratoria in soggetti giovani, il suo ruolo viene rivalutato anche grazie a un innegabile miglioramento delle metodiche diagnostiche.

Le conoscenze relative alla diffusione di questo patogeno nel nostro Paese sono scarse, così come le informazioni relative alla frequenza delle patologie causate da *M. hyorhinis*, sia in termini di dati clinici che di laboratorio. Scopo del presente studio è stato quello di verificare la diffusione di *M. hyorhinis* in due aziende a ciclo chiuso e di valutare la trasmissione dalla scrofa ai suinetti durante il primo mese di vita.

MATERIALI E METODI

Per il presente studio, svolto tra marzo e agosto 2017, sono state selezionate due aziende a ciclo chiuso site in Friuli Venezia Giulia; in tabella 1 vengono riassunte le caratteristiche principali delle due aziende candidate allo studio.

Tabella 1: caratteristiche delle aziende/Breeding farm characteristics

	Azienda 1	Azienda 2
Dimensione (numero di scrofe)	220	250
Genetica	Danese, rimonta esterna	Danese, rimonta esterna
PRRS	Positiva, instabile	Positiva, stabile
Vaccinazioni		
Scrofe	PRRS ogni 3 mesi Parvovirus e Mal Rosso allo svezzamento Rinite atrofica a fine gravidanza	PRRS ogni 4 mesi PCV2 ogni 4 mesi Influenza ogni 4 mesi Rinite a 90giorni di gravidanza Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto
Suinetti	PCV2, <i>M. hyopneumoniae</i> 21 giorni	Colibacillosi 18 giorni PCV2 30 giorni <i>M. hyopneumoniae</i> 80 giorni
Trattamenti		
Scrofe	Ivermectina prima dell'entrata in sala parto	Levamisole
Suinetti	Alla castrazione: cefalosporina Anticoccidico Ferro Allo svezzamento: amoxicillina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico Anticoccidico Ferro Allo svezzamento: amoxicillina
Età di svezzamento	25	26-28
Bande	trisettimanali	trisettimanali

Il piano di campionamento ha previsto il prelievo di tamponi nasali a carico delle scrofe e dei relativi suinetti.-

Da ciascun allevamento sono state identificate tre scrofe al mese per tre mesi successivi. Sono state scelte scrofe di vario ordine di parto in modo da avere un campione rappresentativo di tutte le età; per ciascuna scrofa è stato eseguito il prelievo di un tampone nasale due giorni prima della data prevista del parto.

Dopo il parto, dalla nidiata di ogni scrofa selezionata, sono stati identificati mediante

apposizione di marca auricolare tre suinetti che a 2, 8, 18 giorni di età sono stati sottoposti a prelievo di un tampone nasale; contestualmente al prelievo del tampone nasale dai suinetti si è proceduto alla stessa operazione a carico della madre. Le nidiatae selezionate non sono state sottoposte ad operazione di baliaggio e pareggiamento delle nidiatae.

Al trentesimo giorno di età si è proceduto ad un ulteriore prelievo di tampone nasale a carico dei suinetti, precedentemente identificati. È stato richiesto agli allevatori di conservare i soggetti morti nel corso dello studio al fine di sottoporli ad esame necroscopico volto a determinare le cause della morte. In funzione delle lesioni riscontrate nei soggetti deceduti, sono stati eseguiti esami batteriologici e virologici per identificare gli agenti infettivi più comuni nel suino nelle fasce di età oggetto di studio.

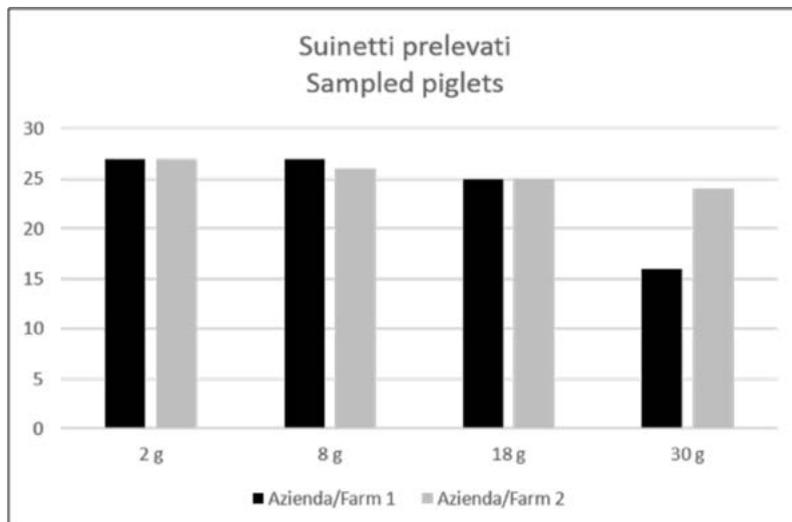
Il campionamento è stato progettato ipotizzando una prevalenza intra-aziendale del 70%, $\alpha=10\%$ e accuratezza=15%; si evidenzia che il numero di suinetti sottoposti al prelievo di tampone nasale è superiore al numero minimo richiesto per la valutazione della prevalenza intra-aziendale in un'azienda di medie dimensioni.

I tamponi nasali sono stati sottoposti alla ricerca di *M. hyorhinis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* tramite multiplex real time PCR per l'evidenziazione di 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). La metodica, sviluppata presso la Sezione di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, prevede l'utilizzo di primer e sonda per DNA eucariotico come controllo interno (Lopez-Andreo et al., 2005).

RISULTATI

In totale sono stati prelevati 72 tamponi nasali da 18 scrofe, 54 da suinetti a 2 giorni di vita, 53 a 8 giorni, 49 a 18 giorni e 41 a 30 giorni di vita; nella Tabella 2 viene mostrata la suddivisione dei prelievi tra le due aziende selezionate.

Tabella 2: numero di suinetti campionati per azienda sul periodo considerato/number of sampled piglets for each farm



11 dei 72 tamponi prelevati da nove differenti scrofe sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, soltanto due scrofe sono risultate positive a più di un campionamento.

Per quanto concerne i suinetti, solo uno dei 54 tamponi prelevati a 2 giorni di età è risultato positivo per *M. hyorhinis* (1.85%; 95% di intervallo di confidenza (95% CI): 0.05-9.89%), 11 tamponi su 53 sono risultati positivi per *M. hyorhinis* a 8 giorni di età (20.75%; 95%CI: 10.84-34.11%), 35 su 51 a 18 giorni (68.63%; 95%CI: 54.11-80.89%) e 37 su 41 a 30 giorni (37/41=90.24%; 95%CI: 76.87-97.28%). Nessuno dei campioni prelevati è risultato positivo per *M. hyopneumoniae*. Nell'azienda 1 dei 27 soggetti sottoposti a campionamento a 2 giorni di età solo un soggetto è risultato positivo (3,7%); a 8, 18 e 30 giorni sono risultati positivi rispettivamente 6/27 (22,2%), 16/25 (64%) e 12/16 (75%) soggetti; nell'azienda 2 non sono state rilevate positività nei soggetti prelevati a 2 giorni di età, mentre il numero di animali positivi rilevato è stato pari a 4/26 (15,4%) a 8 giorni, 19/24 (79,2%) a 18 giorni e 24/24 (100%) a 30 giorni di età. I risultati sono riassunti in tabella 3.

Tabella 3: Risultati/results

Età suinetti (giorni)	Azienda 1		Azienda 2	
	Scrofe positive	Suinetti positivi	Scrofe positive	Suinetti positivi
-2	2/9		3/9	
2	0/9	1/27	0/9	0/27
8	0/9	5/27	1/9	4/26
18	2/9	16/25	3/9	19/24
30		12/17		24/24

Nelle tabelle 4 e 5 viene mostrata la distribuzione dei campioni prelevati dai suinetti risultati positivi per *M. hyorhinis* in funzione dell'età dei suinetti al momento del prelievo.

Tabella 4: distribuzione dei campioni positivi nei suinetti nell'azienda 1/distribution of positive piglets in farm 1

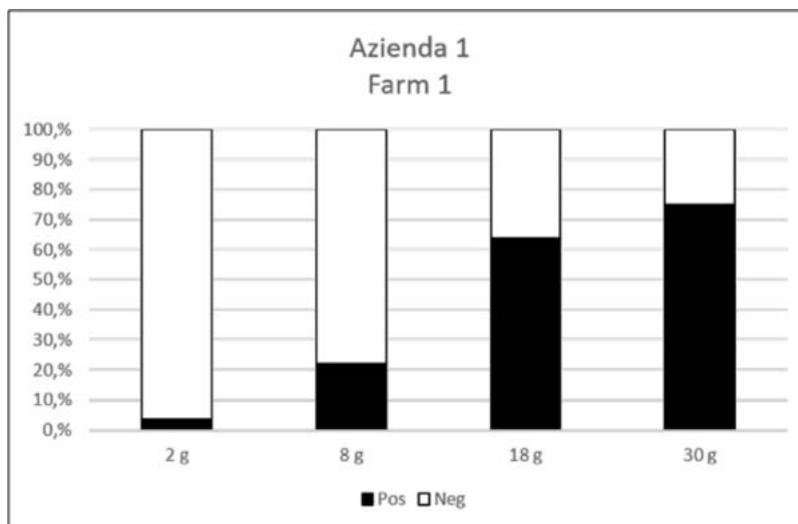
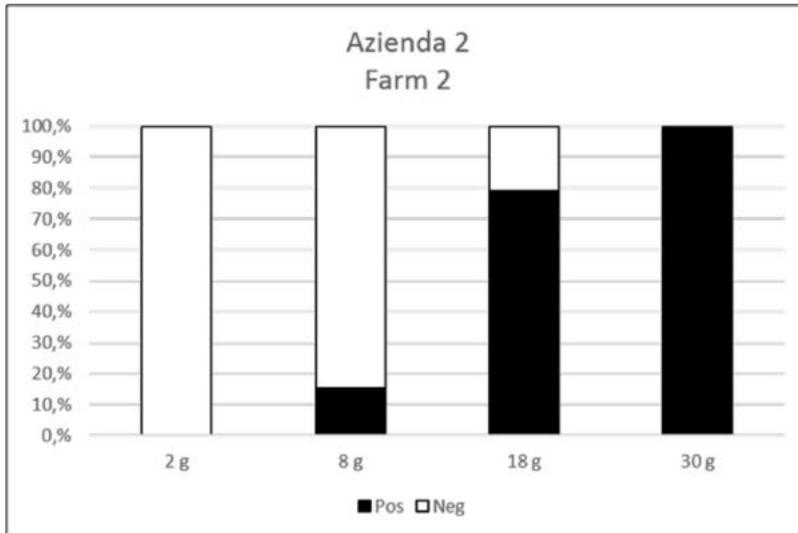


Tabella 5: distribuzione dei campioni positivi nei suinetti nell'azienda 2/ distribution of positive piglets in farm 2



Nel corso dello studio è stata registrata la mortalità di 11 soggetti, tra quelli in esame, nell'azienda 1 e di 4 soggetti dell'azienda 2. Gli esami necroscopici e le successive analisi condotti a carico dei quattro soggetti deceduti nel periodo considerato nell'azienda 2 hanno permesso di ricondurre la causa della morte ad eventi traumatici in 3 soggetti e a meningite da *Streptococcus suis* in un soggetto di 33 giorni, deceduto dopo l'ultimo campionamento; da nessuno di questi soggetti è stata identificata la presenza di *M. hyorhinitis* a livello polmonare. Nell'azienda 1 si è verificata una mortalità importante in uno dei gruppi in analisi. Per problematiche gestionali l'allevatore non ha potuto conservare le carcasse e pertanto non sono stati eseguiti gli esami necroscopici previsti dal protocollo dello studio; le analisi effettuate sui coetanei hanno evidenziato la circolazione del virus della PRRS nel periodo compreso tra i campionamenti a 18 e 30 giorni di età; sia a livello polmonare che meningeo è stato isolato *Streptococcus suis*, mentre non è stata identificata la presenza di *M. hyorhinitis* a livello polmonare.

DISCUSSIONE

M. hyorhinitis viene frequentemente isolato dal tratto respiratorio superiore dei suini e, anche se comunemente considerato un germe commensale delle prime vie aeree, è in grado di diffondere, attraverso meccanismi non ancora pienamente descritti, a vari organi e causare polisierositi e artriti nei suini in svezzamento e magronaggio e artriti nei suini all'ingrasso. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la trasmissione di *M. hyorhinitis* nei suinetti sottoscrofa in due allevamenti a ciclo chiuso siti in Friuli Venezia Giulia.

La distribuzione delle positività nei suinetti suggerisce una instaurazione precoce dell'infezione a livello delle cavità nasali e una rapida diffusione del batterio nella fase sottoscrofa. In entrambi gli allevamenti selezionati si assiste ad un netto aumento dei soggetti positivi tra il primo prelievo a due giorni di vita e il secondo prelievo eseguito a otto giorni di età; nell'allevamento 1 a due giorni un solo soggetto è risultato positivo per *M. hyorhinitis* mentre a otto giorni sono risultati positivi 6/21 soggetti; lo stesso andamento è stato rilevato

nell'allevamento 2 in cui è stata registrata positività in 4/26 soggetti a otto giorni di vita, a fronte di completa negatività a due giorni. I risultati delle analisi condotte sui tamponi nasali prelevati a 18 e 30 giorni hanno rilevato positività rispettivamente in 16/25 e 12/16 soggetti dell'allevamento 1 e 19/24 e 24/24 soggetti dell'allevamento 2, evidenziando una percentuale di soggetti infetti a livello nasale pari al 75% per l'allevamento 1 e pari al 100% per l'allevamento 2. I risultati ottenuti sono parzialmente discordanti con quanto rilevato in precedenti studi; in analogia con lo studio condotto da Clavijo *et al* (2017) il nostro studio ha messo in evidenza che il numero di scrofe eliminatrici per via nasale è numericamente limitato e che il numero di suinetti neonati che albergano *M. hyorhina* a livello nasale nei primi due giorni di vita è molto basso. Il riscontro di un numero limitato di scrofe eliminatrici è indice di eliminazione intermittente del batterio dalle cavità nasali anche se non è possibile escludere altre vie di eliminazione, non indagate in questa ricerca, quali i secreti vaginali e il latte, in analogia con quanto già evidenziato per altre specie di Micoplasmata per esempio *Mycoplasma bovis* in mandrie di bovini. Il nostro studio ha evidenziato una rapida diffusione nella fase sottoscrofa ad iniziare da 8 giorni di età, mentre nello studio di Clavijo *et al* la diffusione di *M. hyorhina* non è stata significativa prima dei 28 giorni di vita. Tale differenza è presumibilmente riconducibile alla differente gestione aziendale in termine di strutture e rimescolamento delle nidiate tra i sistemi di allevamento italiani e americani. Gli esami necroscopici condotti sulle carcasse dei soggetti venuti a morte durante il periodo di studio non hanno evidenziato lesioni ascrivibili all'infezione da *M. hyorhina* e le metodiche biomolecolari applicate non ne hanno messo in evidenza la presenza; *Streptococcus suis* e il virus della PRRS identificati sono caratteristici agenti patogeni del suino nelle fasi di età oggetto di studio. L'assenza di *M. hyorhina* a livello polmonare e articolare è molto probabilmente ascrivibile all'effetto protettivo dovuto alla presenza di anticorpi colostrali, in analogia a quanto descritto in precedenza da altri autori (Fano *et al.*, 2007; Rovira *et al.*, 2006), che impediscono a *M. hyorhina* di aggredire la parte più profonda dell'albero respiratorio ma non svolgono alcun effetto sulla colonizzazione delle vie nasali e, indirettamente, permettono la diffusione del germe negli ambienti di allevamento e la colonizzazione di altri soggetti.

CONCLUSIONI

I dati finora raccolti hanno permesso di identificare una diffusione precoce di *M. hyorhina* nelle prime vie respiratorie dei suinetti. Lo studio sta proseguendo per verificare la diffusione e la permanenza del batterio a livello polmonare oltre che l'associazione con altre eventuali infezioni concomitanti e la gravità delle lesioni anatomo-patologiche e verificare la presenza di *M. hyorhina* nei secreti vaginali delle scrofe e nel latte. Sono inoltre in corso campionamenti in allevamenti a ciclo aperto i cui risultati permetteranno il confronto tra i due sistemi produttivi (ciclo aperto e ciclo chiuso).

Il presente studio rappresenta una delle prime valutazioni sulla presenza di *M. hyorhina* in allevamenti italiani, nonché una base per una valutazione del suo ruolo nella PRDC.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/15 "Ruolo di *Mycoplasma hyorhina* nel Complesso delle Malattie Respiratorie del suino in due diversi sistemi di produzione suinicola del Nord-Est Italia" finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

- Clavijo M.J., Oliveira S., Zimmerman J., Rendahl A., Rovira A. (2014). Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhina*. J Vet Diagn Invest. 2014 Nov;26(6):755-60. doi: 10.1177/1040638714555175. Epub 2014 Oct 15.
- Clavijo M. J., Murray D., Oliveira S., Rovira A. (2017). Infection dynamics of *Mycoplasma*

- hyorhinae* in three commercial pig populations. Vet Rec. 2017 Jul 15;181(3):68. doi: 10.1136/vr.104064. Epub 2017 Apr 19.
- 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.
- Gomes-Neto J.C., Bower L., Erickson B.Z., Wang C., Raymond M., Strait E.L. (2015). Quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinae* in pen-based oral, tonsillar, and nasal fluids. Vet Sci. 2015;16(2):195-201. Epub 2015 Jan 30. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.2.195>
- Kobish, M. e Friis N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. Revue scientifique et technique 15, 1569–605.
- López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2005 Apr 1;339(1):73-82.
- 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.
- Rovira A, Clavijo MJ, Oliveira S. (2010). *Mycoplasma hyorhinae* infection of pigs. Acta Sci Vet 38(Suppl 1):s9–s15.
- Thacker E.L. (2006). Mycoplasmal Disease. In Straw EB et al. Diseases of swine. 9th edition. Ames, IA.: Blackwell Publishing Ltd.; 2006. p. 90, 707–709.