

STUDIO LONGITUDINALE E VARIABILITA' GENOTIPICA DI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN EPISODI DI MALATTIA RESPIRATORIA IN SUINI ALL'INGRASSO

LONGITUDINAL STUDY AND GENETIC VARIABILITY OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN RESPIRATORY OUTBREAKS IN FATTENING PIGS

TONNI M., GUARNERI F., GIACOMINI E., PITOZZI A., LAZZARO M., SCALI F., BONIOTTI B., ALBORALI G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia;

Parole chiave: Complesso malattia respiratoria nel suino, suini all'ingrasso, *Mycoplasma hyopneumoniae*, variabilità genotipica, MLVA.

Key words: Porcine Respiratory Disease Complex, fattening pigs, *Mycoplasma hyopneumoniae*, genetic variability, MLVA.

Riassunto: L'obiettivo dello studio è quello di valutare la dinamica dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) in episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso e caratterizzare la variabilità genetica dei ceppi circolanti. Sono stati esaminati in totale 750 suini provenienti da episodi di malattia respiratoria riscontrati in 5 allevamenti da ingrasso. In ogni episodio sono stati testati 30 suini per la ricerca di M. hyo dapprima al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria, successivamente in fase di convalescenza dopo 4 settimane mediante prelievo di tamponi tracheobronchiali e in fine al momento della macellazione prelevando i polmoni. I campioni sono stati testati mediante RealTime PCR per rilevare la presenza di M. hyo. Un totale di 314 campioni positivi sono stati caratterizzati mediante Multi Locus Variable-number tandem-repeat Analyses (MLVA). L'analisi MLVA è stata eseguita tramite amplificazione delle regioni genomiche Locus 1, Locus 2, p 97-1 e p 97-2. Un'elevata prevalenza di M. hyo in suini all'ingrasso è stata riscontrata al momento della sintomatologia (88%) che è ulteriormente aumentata in fase convalescente (91%). Al momento della macellazione il 64% dei polmoni presentava lesioni e l'83% dei lobi con lesione è risultato positivo per RealTime PCR. La caratterizzazione dei campioni positivi con MLVA ha identificato un totale di 22 ceppi diversi e la presenza di più di un ceppo per allevamento. È stata osservata anche la presenza di più ceppi nello stesso animale. I risultati di questo studio evidenziano che la circolazione di M. hyo in episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso è elevata pur variando in funzione dell'allevamento. Inoltre, la variabilità genetica di M. hyo evidenziata nei diversi allevamenti con focolai di malattia respiratoria suggerisce che la diversità può essere specifica per ogni allevamento.

Abstract: The aim of this study is to assess the infection dynamic of *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) in outbreaks of respiratory disease in fattening pigs and to characterize the genetic diversity of the strains. A total of 750 fattening pigs were selected from respiratory outbreaks from 5 farms. In each outbreak 30 pigs were tested for M. hyo at the time of the appearance of respiratory clinical signs, in the convalescent phase after 4 weeks by tracheobronchial swabs (TBS) and at slaughterhouse by lung sampling. Samples were tested by RealTime PCR to detect the presence of M. hyo. A total of 314 samples were further characterized by Multiple Locus Variable-number tandem repeats Analysis

(MLVA) using amplification of Locus 1, Locus 2, p 97-1, p 97-2. High prevalence of *M. hyo* in fattening pigs was detected at the beginning of outbreak (88%) which increased after 4 weeks (91%). At slaughterhouse, 64% of lungs showed lesions and the 83 % of lobes with lesions was RealTime PCR positive. The characterization of *M. hyo* showed a total of 22 genetic variants and the circulation of more than one strain in each farm. Moreover, different strains have been observed even in the same animal.

The results of this study showed that circulation of *M. hyo* in fattening pigs in outbreaks of respiratory disease is high and varied among farms. In addition, the molecular variability of *M. hyo* detected within farms with respiratory outbreaks suggests that genetic diversity could be farm-specific.

INTRODUZIONE

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyo*) è l'agente eziologico della polmonite enzootica del suino, patologia diffusa in tutte le aree in cui è presente la suinicoltura a carattere intensivo e che causa ingenti perdite economiche dirette ed indirette legate rispettivamente ai costi di medicazione ed al peggioramento delle performance produttive (D. Maes et al., 2008).

M. hyo svolge un ruolo importante nel complesso della Malattia Respiratoria del Suino (PRCD) soprattutto nell'allevamento del suino all'ingrasso (C. Fablet et al., 2012) (M.S. Hansen et al., 2010). La ricerca dei microrganismi che caratterizzano la PRCD e quindi di *M. hyo* è fondamentale per il suo controllo (L. Thacker 2004). I campioni maggiormente diagnostici sono quelli prelevati dalle vie aeree inferiori (C. Fablet et al., 2010) mediante tamponi tracheobronchiali (TBS) oppure lavaggi broncoalveolari (BALF). Utile risulta poi essere la diagnosi anatomopatologica, individuando le cosiddette lesioni *Mycoplasma-like* a livello dei lobi polmonari cranio ventrali, anche se non patognomoniche. La diagnosi di certezza è sempre possibile grazie alla sensibilità della RT PCR che permette di individuare anche poche copie genomiche del microrganismo (L. Thacker 2004).

La valutazione delle lesioni polmonari in sede di macellazione è molto utile, perché oltre a offrire informazioni di tipo ispettivo, fornisce indicazioni per lo studio epidemiologico (M. Sibilia et al., 2007, 2009) permettendo anche l'evidenziazione delle forme subcliniche con il relativo impatto sulle strategie di controllo.

Il genoma di questo microrganismo è caratterizzato da una certa variabilità genomica, proteomica e di virulenza, che ne permettono un miglior adattamento all'ospite (K. Vranckx et al., 2011). In particolare, alcune regioni genomiche, come quella codificante la proteina P97, deputata all'adesione di *M. hyo* con l'epitelio dell'apparato respiratorio dell'ospite, contiene DNA minisatellite ipervariabile detto VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). Sulla base di questa caratteristica è stata messa a punto la tecnica di genotipizzazione batterica MLVA (Multi Locus Variable-numeric tandem-repeat Analyses) che consente la rapida individuazione dei diversi genotipi esistenti (K. Vranckx et al., 2011). In letteratura è riportata la presenza di genotipi diversi circolanti nella stessa area geografica e addirittura isolati nello stesso soggetto (L.G. Pantoja et al., 2016) (L.F. Dos santos et al., 2014). Meno conosciuti sono gli aspetti legati alla virulenza dei diversi genotipi che circolano all'interno di un allevamento e le ripercussioni sulle lesioni evidenziate al macello nei lobi polmonari.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la dinamica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* e caratterizzare la variabilità genetica tra i ceppi evidenziati in 5 episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Tra il 2016 e il 2017 sono stati individuati 5 allevamenti del nord Italia in cui si è verificato un episodio di patologia respiratoria. Al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria, prima dell'inizio della terapia antibiotica, in ogni allevamento sono stati identificati tramite marca auricolare 30 suini selezionando soggetti sia con sintomatologia clinica che conviventi o nei box vicini. In ogni suino identificato è stato eseguito un duplice campionamento con prelievo di tamponi tracheobronchiali (TBS): al momento della comparsa della sintomatologia (1° prelievo) e 4 settimane più tardi (2° prelievo), contemporaneamente sono stati sottoposti a prelievo di sangue per una valutazione sierologica. Inoltre gli stessi animali sono stati seguiti alla macellazione e di ognuno sono stati prelevati i polmoni. In ogni allevamento sono stati prelevati 150 TBS e 30 polmoni

Prelievo dei campioni

Gli allevamenti inclusi nello studio sono stati selezionati in funzione della comparsa di sintomatologia respiratoria caratterizzata da tosse e dispnea che interessava suini all'ingrasso di età superiore a 5 mesi.

Ogni soggetto identificato è stato contenuto tramite torcinaso e l'apertura delle fauci mantenuta grazie all'applicazione di un morso apribocca che ha permesso il prelievo di TBS. La pratica di campionamento prevede l'utilizzo di una sonda monouso in plastica flessibile della lunghezza di circa 60cm (PORTEX® Catheter, Smiths medical ASD, Inc.) che viene inserita nell'adito laringeo al momento di apertura dell'epiglottide e viene poi fatto scivolare lungo l'albero respiratorio fino alla biforcazione bronchiale.

Dopo pochi secondi il tampone viene estratto ed il tratto terminale di 5cm inserito in una provetta sterile preventivamente riempita con 2ml di terreno di trasporto. I campioni ottenuti sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e trasportati in laboratorio il giorno stesso. Contestualmente all'esecuzione dei TBS è stato anche prelevato un campione ematico da tutti i suini, per la verifica della risposta anticorpale.

I polmoni dei suini inclusi nello studio sono stati prelevati in sede di macellazione e successivamente trasportati, mantenendoli a 4°C, alla sezione di Diagnostica di Brescia (IZSLER) per l'attribuzione del punteggio polmonare. Dai lobi polmonari che mostravano lesioni Mycoplasma-like è stato fatto un campionamento di 1g successivamente omogenato in 10 ml di PBS solution.

Indagini di laboratorio

La ricerca di *M. hyo* è stata eseguita mediante Realtime PCR con l'amplificazione di una regione del gene P102. Da ogni campione ottenuto con tampone bronchiale ed omogenato polmonare è stata prelevata un'aliquota di 1ml, sottoposta all'estrazione del DNA batterico tramite l'utilizzo del kit Qiagen® DNA easy blood and tissue kit (Qiagen®, CA, USA) secondo le indicazioni del produttore e con eluizione finale in 100 µl.

La presenza di *M. hyopneumoniae* è stata evidenziata mediante Realtime PCR realizzata in un volume finale di 25µl ottenuti con 12,5 µl di 2X Go Taq Probe qPCR Mastermix (Promega®), 0,5 µM di ogni primer (5' GTCAAAGTCAAAGTCAGCAAAC 3' e 5' AGCTGTTCAAATGCTTGCC 3'), 0,2 µM di sonda P102, 1,75µl Exo IPC Mastermix, 0,15µl Exo IPC DNA, e 5µl di template, utilizzando le condizioni di amplificazione descritte da Marois et al. (2010). I campioni sono considerati positivi con un quantification cycle (Cq) ≤37 e successivamente sottoposti a tipizzazione genomica.

Nei soggetti in cui la PCR è risultata positiva per *M. hyopneumoniae* è stata eseguita la

caratterizzazione molecolare tramite amplificazione dei loci Locus 1, Locus 2, p 97-1 e p 97-2 (Charlebois et al., 2014). In un volume finale di 25µl, 5µl di DNA vengono amplificati in presenza di 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0,2 µM di ciascun primer 1X PCR Buffer II e 1u TaqGold DNA Polimerasi (Applied Biosystem) alle seguenti condizioni di amplificazione: denaturazione di 10 min a 95°C seguiti da 40 cicli a 30 sec 95°C, 30 sec 55°C, 1 min 72° ed un'estensione finale di 7 min 72°C. La dimensione dei prodotti PCR amplificati viene ottenuta tramite elettroforesi capillare (Qiaxcel, Qiagen®) in presenza di marcatori di peso molecolare. Il peso molecolare corrisponde ad n° di ripetizioni della sequenza contenuta nel singolo locus genico. L'insieme del numero di ripetizioni dei 4 loci esaminati costituisce il profilo genico/genotipo dello stesso e viene indicato con un numero

I campioni di siero sono stati testati per la presenza di anticorpi contro la proteina P46 di *M. hyo* mediante ELISA indiretta (ID.vet® *M. hyopneumoniae* indirect kit, Grabels, France) considerando positivi quelli con rapporto S/P >0,4.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Negli allevamenti A, D ed E la prevalenza della positività per PCR è del 100% mentre negli allevamenti B e C è elevata anche se inferiore (rispettivamente 63 e 87 %) (Tabella 1). La prevalenza della positività in TBS del prelievo in fase di convalescenza è uguale o superiore rispetto al 1° prelievo in tutti gli allevamenti eccetto nel B.

La percentuale di polmoni che presentavano lesioni al macello è risultata particolarmente elevata negli allevamenti A, C, D, ed E. Nell'allevamento B la percentuale è risultata inferiore (37%). Nei lobi polmonari con lesioni la positività alla PCR è risultata elevata (83%). Questo potrebbe essere legato alla differente dinamica di circolazione di *M. hyo* in allevamenti con gestione differente in termini di flusso di animali e condizioni sanitarie dell'allevamento da riproduzione di provenienza. Nell'allevamento B infatti erano presenti contemporaneamente animali di pesi diversi che sono stati macellati a distanza superiore a 2 mesi.

Tabella 1. Risultati RealTime PCR in TBS e lobi polmoni per singolo allevamento

allevamento	1° prelievo	2°prelievo	polmoni con score >1	lobi con lesioni / lobi polmoni score >1	PCR + / lobi con lesioni
A	30/30	30/30	25/30	84/175	82/84
B	20/30	18/30	11/30	19/77	16/19
C	22/30	30/30	22/30	58/154	37/58
D	30/30	30/30	18/30	47/126	30/47
E	30/30	18/18	14/20	51/98	51/51
Totale campioni	150	138	140	630	259
Totale positivi	132	126	90	259	216
% positivi	88%	91%	64%	41%	83%

L'indagine sierologica ha evidenziato un incremento della sieropositività (Tabella 2), dal 57% del primo prelievo all'89% nel secondo prelievo dopo 4 settimane. In particolare negli allevamenti A, C, D, si è osservata una netta sieroconversione mentre negli allevamenti B e E la percentuale dei soggetti positivi si presentava elevata sin dal primo prelievo. Tale situazione potrebbe essere legata al fatto che in questi ultimi allevamenti la circolazione di *M. hyo* fosse precedente all'inizio della sintomatologia.

Tabella 2. Sieropositività di *M. hyo* al momento della comparsa della sintomatologia e 4 settimane più tardi

	A	B	C	D	E	Totale campioni	Totale positivi	% positivi
1° Prelievo	4/30	20/30	18/30	15/30	28/30	150	85	57%
2° Prelievo	26/30	21/30	29/30	29/30	19/20	140	124	89%

Di seguito vengono riportati i risultati della caratterizzazione molecolare dei ceppi di *M. hyo* ottenuti in TBS e lobi polmonari appartenenti ai suini dei 5 allevamenti inclusi nello studio (Tabella 3).

Tabella 3. Risultati della caratterizzazione molecolare dei ceppi di *M. hyo* evidenziati in TBS e polmoni

		Allevamento				
		A	B	C	D	E
genotipi	1° Prelievo	5	1	2	4	1
	2° Prelievo	4	1	2	5	2
	Polmoni	3	6	5	3	2
	Totale	6	>6	6	6	2
animali	1 solo ceppo (1° Prelievo)	24/30	15/15	16/20	26/28	29/29
	più di 1 ceppo (1° Prelievo)	4/30	0/15	4/20	2/28	0/29
	1 solo ceppo (2° Prelievo)	15/30	12/12	21/27	26/28	18/18
	più di 1 ceppo (2° Prelievo)	5/30	0/12	6/27	2/28	0/18
polmoni	1 solo ceppo	7/24	2/8	10/21	8/10	9/14
	più di 1 ceppo	17/24	6/8	12/21	2/10	5/14

Sono stati identificati un totale di 22 varianti genetiche. In 4 allevamenti si osserva la circolazione di 6 o più ceppi geneticamente diversi mentre nel 5° allevamento sono stati rilevati solo 2 ceppi. In 23 TBS e 42 polmoni sono stati rilevati ceppi diversi provenienti dallo stesso animale o dallo stesso lobo polmonare. Questa situazione si verifica in particolari nei polmoni di animali di allevamenti A, B e C.

Nell'allevamento B, C ed E al momento della comparsa della sintomatologia è stato osservato un numero limitato di ceppi (1-2). Nei polmoni è stato evidenziato un numero superiore di ceppi (5-6) in tutti gli allevamenti eccetto che per l'allevamento E dove la macellazione è avvenuta dopo 3 settimane dall'inizio del focolaio. Inoltre va sottolineato che nell'allevamento B i primi 20 polmoni presentano un unico ceppo mentre negli ultimi 10 sono stati osservati > 6 ceppi. In questo allevamento peraltro gli animali sono stati macellati in due momenti diversi: i primi 20 dopo 8 settimane dal focolaio e gli ultimi 10 dopo 16 settimane.

Negli allevamenti C ed E, 3 dei ceppi osservati sono comuni indicando la circolazione degli stessi ceppi tra allevamenti diversi.

CONCLUSIONI

I risultati delle PCR su TBS eseguiti su suini al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria indicano che *M. hyo* è coinvolto in maniera importante nei focolai inclusi nello studio. L'elevata sieroprevalenza riscontrata dopo 4 settimane dal momento della segnalazione del focolaio conferma ulteriormente l'elevata circolazione di *M. hyo* nei focolai. Per quanto riguarda la variabilità genotipica è stato osservato che il numero dei ceppi coinvolti varia da allevamento ad allevamento e che nello stesso animale possono essere presenti più ceppi, in accordo con quanto riportato in letteratura (A. Michiels et al., 2017). Solo recentemente è stata segnalata l'associazione tra gravità dell'infezione da *M. hyo*, numero di ceppi circolanti e intensità delle lesioni polmonari (A. Michiels et al., 2017). È importante sottolineare che, come noto, sono numerosi i fattori che possono influenzare la gravità della sintomatologia respiratoria nei suini all'ingrasso e successivamente delle lesioni polmonari riscontrate al macello. L'ampliamento delle indagini ad altri episodi di malattia respiratoria in suini in accrescimento e ulteriori approfondimenti in merito alle caratteristiche ed alla gestione dell'allevamento, alle misure di biosicurezza e alla presenza di co-patogeni consentiranno di migliorare le conoscenze in merito alla dinamica dell'infezione anche in suini pesanti.

BIBLIOGRAFIA

- Fablet C., Marois C., Kobisch M., Madec F., Rose N., (2010). Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet. Microbiology* 143 238–245
- Fablet C., Marois-Crehan C., Simon G., Grasland B., Jestin A., Kobisch M., Madec F., Rose N., (2012). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Vet. Microbiology* 157 152–163
- Hansen M. S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M., Nielsen O.L., (2010). An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory. *J. of Comp. Pathology* Vol. 143 120-131
- Madec, F., and M. Kobisch, (1982). Bilan lesionnel des poumons de porcs charcutiers al'abattoir. *Journ. Rech. Porc. Fr.* 14, 405–412.
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F., (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiology* 126, 297–309.
- 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. 108(5), 1523-33

- Michiels A., Vranckx K., Piepers S., Del Pozo Sacristán S., Arsenakis I., Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., (2017). Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. Vet. Res. 48:2
- Sibila M., Nofrari´ M., Lo´pez-Soria S., Segale J., Valero O., Espinal A., Calsamiglia M., (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. Vet. Microbiology 122 97–107
- Sibila M., Pieters A, Molitor T., Maes D., Haesebrouck F., Segale´s J., (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection The Vet. Journal 181 221–231
- Thacker E. L., (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Animal Health Research Rev. 5(2) 317–320
- Vranckx, K., Maes D., Calus D., Villarreal I., Pasmans F., Haesebrouck F., (2011). Multiple locus variable number of tandem repeats analysis is a suitable tool for the differentiation of *M. hyopneumoniae* strains without cultivation. J. Clin. Microbiol. 49, 2020–2023.