

INDAGINI SU HAEMOPHILUS PARASUIS COME CAUSA DI RIFORMA ANTICIPATA NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO

INVESTIGATION ON HAEMOPHILUS PARASUIS AS A CAUSE OF EARLY SLAUGHTER IN GROWING PIGS

VEZZOLI F.¹, BORELLA L.¹, SANTORO E.¹, LUPPI A.², BONILAURI P.²,
NEGRI M.³, LUINI M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna,
Sezione di Reggio - Emilia;

³ A.S.L. della Provincia di Lodi.

Parole chiave: PRDC, *Haemophilus parasuis*, Sierotipizzazione, Genotipizzazione
Key words: PRDC, *Haemophilus parasuis*, Serotyping, Genotyping

Riassunto

Obiettivi - Il nostro lavoro ha indagato sul ruolo di *Haemophilus parasuis* come causa di riforma nei suini in accrescimento nell'intento di dare un contributo preliminare alle conoscenze sulla caratterizzazione sierologica e molecolare di questo microrganismo.

Materiali e metodi - In totale sono stati analizzati 89 suini provenienti da 9 diversi allevamenti, riformati anticipatamente ad un peso di 15/25 kg. Sono state registrate le lesioni anatomopatologiche, in particolare quelle a carico degli organi toracici, sui quali sono stati eseguiti esami batteriologici e PCR per *Mycoplasma Hyopneumoniae*. La viremia per PRRSV e PCV2 dei soggetti è stata analizzata con *Real-Time* PCR. I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati sierotipizzati tramite Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) e genotipizzati con RFLP-PCR del gene *ompA* e con multiplex PCR dei geni *vtaA*.

Risultati - La lesione più frequentemente riscontrata è stata la broncopolmonite catarrale o catarral-purulenta (32), seguita da polisierosite fibrinosa (6), polmonite (4) e pleuropolmonite fibrino-necrotica (2). In 13 casi la broncopolmonite era accompagnata da quadri di pleurite (4), pericardite (2), pleurite e pericardite (6) fibrinose o da polisierosite fibrinosa (1). Nel complesso, il 54% degli animali presentava lesioni riferibili a PRDC. Sono stati isolati 14 ceppi di *Haemophilus parasuis* (15.7%), 6 di *Streptococcus suis* (6.7%), 6 di *Bordetella bronchiseptica* (6.7%), 5 di *Arcanobacterium pyogenes* (5.6%), 5 di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (5.6%) e 3 di *Pasteurella multocida* (3.5%). Cinque soggetti sono risultati positivi per *M. hyopneumoniae*. In 7 allevamenti su 8, sebbene con prevalenze differenti, gli animali testati sono risultati viremici per PRRSV (72.4%), mentre solo 5 soggetti lo sono risultati per PCV2 (5.7%). Dei 14 ceppi di *H. parasuis* isolati, 2 sono stati sierotipizzati come sierotipo 13, 2 come sierotipo 14, 1 come sierotipo 4 e 1 come sierotipo 2. Sette ceppi sono risultati non tipizzabili con gli antisieri nei confronti di *Haemophilus parasuis* impiegati nello studio (sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, 14). La genotipizzazione ha evidenziato che 11 ceppi su 14 possedevano 1, 2 e 3 *vtaA* mentre 3 ceppi solo 1 e 3 *vtaA*. Sono stati individuati 4 diversi profili RFLP-PCR (BA, BB, BD, CD), dei quali solo 1 presente in due allevamenti diversi. Due profili diversi sono anche stati riscontrati nello stesso allevamento.

Conclusioni - Lesioni a carico dell'apparato respiratorio riferibili a PRDC sono state il principale reperto di macellazione nei gruppi da noi considerati e *H. parasuis* è stato il microrganismo di più frequente isolamento. Ad eccezione del sierotipo 14, tutti i ceppi

sono risultati riportabili a sierotipi comunemente riscontrati in Italia e associati a patologia. Anche le analisi di genotipizzazione hanno evidenziato ceppi di *H. parasuis* appartenenti a genotipi associati a patologia, isolati raramente da soggetti sani. Un ampliamento della casistica che includa diversi profili clinico-patologici, compresi soggetti sani, potrebbe avvalorare l'importanza di queste analisi per caratterizzare i ceppi in funzione della diagnosi e della produzione di vaccini mirati.

ABSTRACT

Objectives - We have investigated the role of *Haemophilus parasuis* as cause of early slaughter in growing pigs. The serological and molecular characterization of the isolated strains has been carried out.

Methods - A total of 89 pigs from 9 different farms and early slaughtered at 15/25 kg were analyzed. Pathological lesions were recorded, with particular attention to those involving thoracic organs. The latter have been examined with bacteriological analysis and PCR for the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. The PRRSV and PCV2 viremia was determined by Real-Time PCR. *H. parasuis* isolates were serotyped by Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) using specific antisera against serovars 2, 4, 5, 12, 13, 14 and genotyped by PCR-RFLP of the *ompA* gene and by multiplex PCR of *vtaA* genes.

Results - Bronchopneumonia was the most frequently observed lesion (32), followed by polyserositis (6), pneumonia (4) and pleuropneumonia (2). In 13 cases, bronchopneumonia was associated with pleuritis (4), pericarditis (2), pleuritis and pericarditis (6) or polyserositis (1). Overall, 54% of the pigs showed lesions related to PRDC. Fourteen strains (15.7%) of *H. parasuis*, 6 (6.7%) of *Streptococcus suis*, 6 (6.7%) of *Bordetella bronchiseptica*, 5 (5.6%) of *Arcanobacterium pyogenes*, 5 (5.6%) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and 3 of *Pasteurella multocida* (3.5%) were isolated. Five subjects were found positive to *M. Hyopneumoniae*. PRRSV was found in pigs from all farms except one (72.4%), while only 5 subjects were PCV2 positive (5.7%). Out of 14 isolates of *H. parasuis*, 2 were serovar 13, 2 serovar 14, 1 serovar 4 and 1 serovar 2. The remaining seven strains were non-typable as serovars 2, 4, 5, 12, 13, 14. The genotyping showed that 11 of 14 strains possessed 1, 2 and 3 *vtaA* genes while 3 strains only 1 and 3 *vtaA*. Four different RFLP-PCR profiles (BA, BB, BD, CD) were identified, of which only 1 found in two different farms. One farm was found positive for two different profiles.

Conclusions - PRDC related lesions of the respiratory tract were the main findings in the groups we have considered and *H. parasuis* was the most frequently isolated microorganism. With the exception of serotype 14, all strains were assigned to serovars commonly found in Italy and considered very or moderately pathogenic. Moreover, as reported by the genotyping analysis, the *H. parasuis* strains belong to genotypes that are associated with disease and rarely isolated from healthy subjects. New investigations including pigs characterized by different clinicopathological profiles and healthy subjects could complete our preliminar data and obtain better diagnostic tools and more appropriated vaccines.

INTRODUZIONE

La redditività dell'allevamento suino è data dalla capacità di ottenere animali pronti per il macello nel minor tempo possibile, sfruttando al massimo le caratteristiche genetiche degli stessi, ottenendo un prodotto che rispecchi le caratteristiche richieste dai macellatori e dai consumatori, ottenendo il miglior ritorno economico possibile riducendo al minimo i costi legati alle malattie, causa di perdite (scarti e mortalità) e spese per farmaci.

Le cause di riforma in suini in accrescimento sono numerose, sia di origine infettiva che legate a

fattori ambientali e gestionali e sono conseguenti a patologie che coinvolgono prevalentemente l'apparato respiratorio, gastroenterico e locomotore. In particolare, le infezioni respiratorie sono uno dei principali problemi sanitari in questa fase di allevamento e sono causa di importanti danni economici e riduzione del benessere degli animali allevati (Sorensen *et al.*, 2006). Il complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC) è una problematica multifattoriale che colpisce gli animali a partire dalle 12/14 settimane d'età (Thacker, 2001; Kim *et al.*, 2003, Hansen *et al.*, 2010), la cui morbilità e mortalità possono variare rispettivamente dal 10 al 40% e dal 2 al 20% (Harms *et al.*, 2002). L'impatto economico delle infezioni respiratorie è considerevole e risulta maggiore se l'infezione è precoce o è aggravata da altre infezioni o da avverse condizioni ambientali. Queste possono agire sui patogeni interagendo sulla loro diffusione (es. quantità di microorganismi a cui sono esposti gli animali) o sui suini stessi intervenendo sui meccanismi di difesa degli animali, sia innati che acquisiti (Gonyou *et al.*, 2006).

PRRSV (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus), PCV2 (Porcine Circovirus 2), SIV (Swine Influenza Virus) e PRV (Pseudorabies Virus) sono i principali virus coinvolti, mentre tra i batteri, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* sono quelli più frequentemente isolati in corso di PRDC, a cui si aggiunge *Mycoplasma hyopneumoniae*.

H. parasuis, agente eziologico della malattia di Glässer, è ritenuto fra i più importanti agenti coinvolti nella PRDC ed è responsabile di elevata morbilità e mortalità nei suini già a partire dalla fase di svezzamento (Oliveira and Pijoan, 2004). Da un punto di vista anatomopatologico l'infezione è caratterizzata da polisierosite fibrino-purulenta, artrite e meningite. *H. parasuis* può essere isolato anche nel tratto respiratorio superiore di suini sani come parte della normale flora batterica (Kielstein e Rapp-Gabrielson 1992; Oliveira and Pijoan 2004). Esistono almeno 15 diversi sierotipi di *H. parasuis* differenziati sulla base delle loro varianti antigeniche superficiali (Kielstein e Gabrielson, 1992). Sebbene alcuni sierotipi si siano dimostrati più virulenti rispetto ad altri, non è stata dimostrata una correlazione assoluta tra sierotipo e gravità della patologia nei gruppi colpiti. Questa associazione è complicata dal fatto che all'interno del medesimo sierotipo è stata riscontrata una certa variabilità di risposta e che una parte non trascurabile dei ceppi isolati non risulta tipizzabile con gli attuali mezzi a disposizione (Blackall *et al.*, 1997). Diverse tecniche di genotipizzazione sono state applicate nello studio della variabilità di *H. parasuis* e sono principalmente: fingerprinting tramite ERIC-PCR (Rafiee *et al.*, 2000), MLST (Olvera *et al.*, 2006a), analisi di sequenza parziale del gene codificante Hsp60 (Olvera *et al.*, 2006b) e PCR su geni che codificano fattori di virulenza. Le proteine di membrana (OMPs) e tra queste in particolare OmpA sono coinvolte in vari processi patogenetici tra i quali l'adesione ed invasione cellulare e per questo possono essere buoni indicatori di virulenza (Smith *et al.*, 2007; Dabo *et al.*, 2003; Prasadarao *et al.*, 1996). Recentemente è stata proposta la genotipizzazione basata su una PCR-RFLP del gene *ompA* che discrimina i ceppi in 8 genotipi (profili di restrizione), dei quali solo alcuni sarebbero associati a patologie caratteristiche dell'infezione da *H. parasuis* (Chu *et al.*, 2011). Un altro fattore di virulenza importante sarebbe rappresentato da VtaA, un autotrasportatore associato alla membrana, costituito da tre domini funzionali codificati dai geni 1 *vtaA*, 2 *vtaA* e 3 *vtaA*. Mentre 3 *vtaA* è altamente conservato in tutti i ceppi invasivi e non, 1 *vtaA* e 2 *vtaA* sono stati riscontrati solo nei ceppi invasivi e non in quelli isolati dalle vie respiratorie superiori. In particolare si potrebbero considerare virulenti tutti gli isolati che possiedono 1 *vtaA* e 3 *vtaA* (Olvera *et al.*, 2011).

Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare sul ruolo di *H. parasuis* tra le cause di riforma dei suini in accrescimento. Secondo obiettivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare dal punto di vista sierologico e molecolare i ceppi di *H. parasuis* isolati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio è stato condotto su un campione di 89 suini da riforma di peso compreso tra 15 e 25 kg, di razza ibrido commerciale, macellati nel periodo settembre / dicembre 2011. Nell'indagine sono stati coinvolti suini provenienti da 8 allevamenti (6 a ciclo chiuso e 2 a ciclo aperto) delle provincie di Lodi, Milano, Cremona e Brescia e suini di una partita d'importazione olandese. In fase di macellazione, per ciascuna soggetto sono stati prelevati gli organi toracici, addominali e un campione di sangue. I campioni sono stati successivamente conferiti ai laboratori della sezione diagnostica di Lodi dell'IZSLER, dove si è proceduto alla registrazione dei quadri anatomopatologici ed ai successivi esami di laboratorio.

Esami batteriologici

Le analisi batteriologiche sono state eseguite su polmone, fegato, milza di ogni soggetto e, ove possibile, dal liquido pericardico. Le semine sono state eseguite su Agar Siero (10% siero equino), Mc Conkey Agar ed Agar Sangue (5% g.r. ovini) arricchito con uno striscio di *Staphylococcus aureus*, per la crescita dei batteri NAD-dipendenti come *H. parasuis*. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore (in termostato a CO₂ al 10% per l'Agar Sangue). I batteri isolati sono stati tipizzati in base alle caratteristiche colturali e dopo colorazione di Gram attraverso test biochimici opportunamente allestiti o con gallerie miniaturizzate (API Biomerieux). Lo sviluppo di colonie sospette di *H. parasuis* (crescita satellite intorno allo *S. aureus*) è stato ulteriormente confermato tramite PCR secondo il metodo indicato da Oliveira *et al.* (2001). La ricerca di *M. hyopneumoniae* è stata eseguita su tessuto polmonare tramite PCR come descritto da Mattsson *et al.* (1995).

Esami virologici

Sono stati eseguiti sui campioni di siero di 8 aziende tramite PCR *Real-Time* per la ricerca di *Porcine Circovirus type 2* (PCV2) secondo il protocollo descritto da Olvera *et al.* (2004) e per la ricerca del virus della PRRS, utilizzando il kit TaqMan® NA and EU PRRSV (Ambion®-Applied Biosystem), che permette di differenziare il genotipo europeo da quello americano.

Caratterizzazione di *H. parasuis*

Sierotipizzazione - I ceppi isolati sono stati tipizzati mediante il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), tramite l'utilizzo di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12, 13 e 14 secondo il protocollo descritto da Luppi *et al.* (2010). La scelta dei sieri anti-*H. parasuis* da impiegare nella tipizzazione dei ceppi isolati si è basata sulla valutazione dei dati di prevalenza raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi paesi europei (Blackall *et al.*, 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliveira and Pijoan, 2004; Angen *et al.*, 2004). Oltre a questo parametro, nella scelta degli antisieri da utilizzare, è stato considerato il grado di virulenza dei singoli sierotipi (il pannello di antisieri a nostra disposizione permette la sierotipizzazione della maggioranza dei sierotipi a media e ad alta virulenza) e la possibilità di valutare l'eventuale omologia tra i sierotipi circolanti e quelli presenti nelle preparazioni vaccinali.

Genotipizzazione - È stata condotta su colture batteriche risospese in PBS e dopo estrazione del DNA con il kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN). La PCR-RFLP del gene *ompA* è stata eseguita utilizzando i primers e il protocollo di reazione descritti da Chu *et al.* (2010). Il prodotto di PCR è stato sottoposto a RFLP con l'utilizzo separato di due enzimi *Msp*II e *Dde*I ed i profili di restrizione registrati secondo i possibili risultati: AA, BA, BB, BC, BD, CA, CB, CD. La genotipizzazione basata sui geni *vtaA* è stata eseguita secondo quanto descritto da Olvera *et al.*, 2011. La metodica prevede due PCR: una specifica per *2vtaA* e una multiplex-PCR per rilevare 1 *vtaA* e 3 *vtaA*.

RISULTATI

Lesioni anatomopatologiche. Il maggior numero di osservazioni riguardano l'apparato respiratorio, dove pleuropolmoniti, broncopolmoniti e/o pleuriti/pericarditi, da sole o associate a polisierosite sono state osservate in 48 animali inclusi nello studio (54%). Sono stati registrati 32 casi di broncopolmonite, in 19 dei quali rappresentava l'unica lesione osservata a carico degli organi toracici. In 16 casi si trattava di broncopolmonite apicale catarrale o catarral-purulenta di modica estensione con consolidamento del parenchima ed iperemia più o meno evidente. In 3 casi l'interessamento polmonare era bilaterale ed esteso anche ai lobi diaframmatici, di cui 1 in presenza di numerosi ascessi. In 13 casi la broncopolmonite era accompagnata da quadri di pleurite (4), pericardite (2), pleurite e pericardite (6) fibrinose o da polisierosite fibrinosa (1). In 4 soggetti è stata evidenziata una polmonite bilaterale generalizzata, di cui 1 associata a pleurite fibrinosa, mentre in 2 soggetti sono stati evidenziati sequestri necrotici con pleurite circoscritta. In 6 soggetti è stata evidenziata polisierosite fibrinosa con interessamento pleurico, pericardico e peritoneale. In 5 casi le uniche lesioni osservate a carico degli organi toracici sono state: pleurite fibrinosa (3), grave pericardite fibrino-purulenta (1) e pericardite associata a pleurite fibrinosa (1). Le lesioni a carico dell'apparato gastroenterico sono state evidenziate principalmente a carico del grosso intestino, rappresentate da colite con dilatazione delle anse, presenza di contenuto schiumoso di colore grigiastro e presenza di noduli biancastri nella sottomucosa. Queste lesioni sono state osservate in 26 soggetti (29%). Mentre gastriti ed ulcere sono state osservate in 15 soggetti (17%). Le altre lesioni sono state osservate con frequenza notevolmente inferiore e vengono per completezza riportate in Tabella 1.

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE	ALLEVAMENTO (N° CAMPIONI)									TOTALE
	A (10)	B (20)	C (10)	D (8)	E (10)	F (10)	G (7)	H (10)	I (4)	
BRONCOPOLMONITE	2	6	3	2	5	1	3	6	4	32
PLEURITE / PERICARDITE	3	2	1	1	2		3	3	3	18
POLISIEROSITE	4	1						1		6
PLEUROPOLMONITE			1		1					2
POLMONITE		1	2		1					4
ENDOCARDITE VALVOLARE	1									1
ENTERITE / ENTEROCOLITE	1	5	8	4	1	3	2	2		26
DEGENERAZ. EPATICA	1			1	1	1	2			6
GASTRITE CRONICA				1		4				5
ULCERA GASTRICA				1	3		3	3		10
ERNIE ADDOMINALI/ INGUINALI		1			2	2				5
DERMATITE			5	3						8
ARTRITE / ARTROSINOVITE	3		1				1	3		8
ANEMIA GENERALIZZATA	1									1

Tabella 1. Rassegna delle lesioni anatomopatologiche riscontrate nei 9 allevamenti inclusi nello studio.

Table 1. Review of the pathologic lesions observed in the 9 farms involved in the study.

Esami batteriologici. Gli esiti delle indagini batteriologiche mettono in evidenza come *H. parasuis* sia stato il patogeno più frequentemente riscontrato, con un totale di 14 isolamenti, interessando 6 dei 9 allevamenti considerati. Gli altri microrganismi isolati sono risultati in ordine di frequenza: *Streptococcus suis* (6.7%), *Bordetella bronchiseptica* (6.7%), *Arcanobacterium pyogenes* (5.6%), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (5.6%), *Pasteurella multocida* (3.5%). In 4 casi *H. parasuis* è stato isolato in associazione con *Streptococcus suis*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae* e *A. pyogenes* (Tabelle 2 e 3). I dati relativi alle sedi di isolamento dei ceppi di *H. parasuis* sono riportati in dettaglio nella tabella 5 a cui si rimanda. La ricerca di *M. hyopneumoniae* mediante PCR ha evidenziato 4 campioni positivi nei suini di provenienza olandese ed 1 positivo nell'allevamento G.

ALLEVAMENTO	ESITI BATTERIOLOGICI
A	<i>H. Parasuis</i> / <i>P. multocida</i>
B	<i>H.. Parasuis</i>
C	<i>A. Pleuropneumoniae</i> / <i>S. Suis</i>
D	<i>H. Parasuis</i> / <i>P. Multocida</i>
E	<i>H. Parasuis</i> / <i>A. Pleuropneumoniae</i> / <i>P. multocida</i> / <i>S. Suis</i>
F	<i>H. Parasuis</i> / <i>S. Suis</i>
G	<i>A. Pyogenes</i> / <i>S. Suis</i> / <i>M. hyopneumoniae</i>
H	<i>B. Bronchiseptica</i> / <i>S. Suis</i>
I	<i>A. Pyogenes</i> / <i>H. parasuis</i> / <i>B. Bronchiseptica</i> / <i>S. suis</i> / <i>M. hyopneumoniae</i>

Tabella 2. Risultati degli esami batteriologici per ciascun allevamento di provenienza.
Table 2. Results of the bacteriological examinations for each farm.

BATTERI ISOLATI	ANIMALI POSITIVI		N° AZIENDE POSITIVE
	N°	%	
<i>H. Parasuis</i>	14	15.7%	6
<i>S. Suis</i>	6	6.7%	6
<i>B. Bronchiseptica</i>	6	6.7%	2
<i>A. Pyogenes</i>	5	5.6%	2
<i>A. Pleuropneumoniae</i>	5	5.6%	2
<i>M. hyopneumoniae</i> *	5	5.6%	2
<i>P. Multocida</i>	3	3.5%	3

Tabella 3. Isolamenti batterici in ordine di frequenza e numero delle aziende in cui ciascun patogeno è stato riscontrato.* Evidenziato tramite PCR.

Table 3. Bacterial isolates ranked by isolation frequency and number of farms in which each pathogen was found.

* Detected by PCR..

Esami virologici - L'infezione da PRRSV è stata dimostrata in 7 delle 8 aziende campionate, con prevalenza variabile dal 63% al 100% dei soggetti analizzati. Complessivamente sono stati esaminati i sieri di 87 animali e di questi il 72.4% sono risultati positivi alla PCR *Real-Time*. Il titolo virale (espresso in \log_{10} copie cDNA) è risultato variabile fra 2.8 e 8.9 con medie intra-allevamento comprese fra 3.6 e 8.0 (Tabella 4). Relativamente all'infezione da PCV2, sono risultati positivi 5 soggetti, appartenenti a 3 diversi allevamenti, con una percentuale di positività complessiva del 5.7%. I soggetti di un solo allevamento sono risultati completamente negativi verso entrambe le infezioni virali indagate.

AZIENDA	N° CAMP.	PRRSV			PCV2		
		N° POS.	% POS.	TITOLO*	N° POS.	% POS.	TITOLO**
A	11	9	81.8%	7.5 (4.0-8.5)	0	-	-
B	19	12	63.2%	7.1 (3.7-8.0)	0	-	-
C	10	10	100%	6.6 (3.6-7.3)	0	-	-
D	9	7	77.8%	3.6 (2.8-4.1)	3	33.3%	3.7 – 3.2 – 4.5
E	10	9	90%	5.8 (3.4-6.6)	0	-	-
F	10	0	-	-	0	-	-
G	8	6	75%	6.8 (3.4-7.6)	1	12,5%	4.0
H	10	10	100%	8.0 (4.6-8.9)	1	10%	5.8

Tabella 4. Numero e percentuale dei soggetti risultati positivi verso PRRSV e PCV2 nelle aziende incluse nello studio e relativa titolazione virale. *Media \log_{10} copie di cDNA (limiti minimo e massimo); ** \log_{10} copie di DNA.

Table 4. Number and percentage of PRRSV and PCV2 positive subjects for each farm and their relative viral titer.

* mean \log_{10} copies of cDNA (minimum and maximum); ** \log_{10} copies of DNA.

Caratterizzazione di *H. parasuis*. I 14 ceppi sottoposti a sierotipizzazione sono stati identificati come sierotipo 13 (2/14), sierotipo 14 (2/14), sierotipo 2 (1/14) e sierotipo 4 (1/14) mentre 7 dei 14 ceppi sono risultati non tipizzabili come sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, 14. La genotipizzazione ha evidenziato che 11 ceppi su 14 possedevano 1, 2 e 3 *vtaA* e 3 ceppi solo 1 e 3 *vtaA*. Sono stati individuati 4 diversi profili RFLP (BA, BB, BD e CD), dei quali BD presente in 2 allevamenti diversi. Due profili diversi sono anche stati riscontrati nello stesso allevamento (BB e BD). (Tabella 5).

AZ.	N°	LESIONI	FONTE	PCR <i>vtaA</i>	RFLP	SIEROT.
A	2	ARTROSINOVITE, POLISIEROSITE FIBRINOSA	PERICARDIO	1,2,3- <i>vtaA</i>	BB	13
		ARTROSINOVITE, POLISIEROSITE FIBRINOSA	PERICARDIO	1,2,3- <i>vtaA</i>	BB	13
B	5	BRONCOPOLMONITE APICALE, PERICARDITE	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	BB	4
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,3- <i>vtaA</i>	BD	*
		POLMONITE	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	BD	*
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,3- <i>vtaA</i>	BD	*
D	1	BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	BA	2
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,3- <i>vtaA</i>	nd	nd
E	3	BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	CD	*
		PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	CD	*
		PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	CD	*
F	1	BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	BD	*
I	2	PERICARDITE, PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA CON ASCESSI	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	BA	14
		PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA	POLMONE	1,2,3- <i>vtaA</i>	nd	14

Tabella 5. Risultati della sierotipizzazione e genotipizzazione di *H. parasuis* e correlazione con i quadri anatomopatologici osservati a carico degli organi toraci. nd: dato non disponibile; * ceppo non appartenente ai sierotipi 2,4,5,12,13,14.

Table 5. Results of serotyping and genotyping of *H. parasuis* and their correlation with pathological lesions observed in thoracic organs. nd: data not available; * strain not belonging to serotypes 2,4,5,12,13,14.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia come le infezioni che concorrono a determinare la PRDC siano la principale causa di riforma nei gruppi di animali considerati, nei quali l'infezione da PRRSV ha probabilmente svolto un ruolo molto importante, sia direttamente che agendo sinergicamente con altri virus o batteri. L'altissima diffusione di questo virus nella fase di allevamento considerata è dimostrata dal 72% di animali viremici, dato peraltro atteso, trattandosi di un'infezione che colpisce soprattutto soggetti di età compresa tra le 8 e 12 settimane (Pavesi *et al.*, 2011). Solo 5 animali (5,7%) sono risultati viremici per PCV2. Questo risultato, se da una parte conferma la circolazione di questo virus negli allevamenti, dall'altra suggerisce, vista l'elevata diffusione della vaccinazione, una buona capacità della stessa a limitare la durata della viremia e la carica virale (Fort *et al.*, 2009).

I batteri isolati dai polmoni sono quelli comunemente osservati a carico dall'apparato

respiratorio di suini con PRDC. Fra questi *H. parasuis* è quello risultato maggiormente diffuso, il che conferma il ruolo dello stesso come importante causa di riforma in suini in accrescimento. Questa elevata percentuale di isolamento può essere stata facilitata dall'utilizzo di campioni ottimamente conservati ed analizzati entro poche ore dalla macellazione. Anche in altri soggetti dove *H. parasuis* non è stato isolato erano presenti lesioni riferibili a polisierosite da cui non è stato ottenuto l'isolamento di altri patogeni batterici, salvo *Bordetella bronchiseptica* in un caso. Non è pertanto da escludere un suo maggiore coinvolgimento nel determinismo delle patologie osservate. In numerosi casi il reperto di macellazione associato all'isolamento di *H. parasuis* era rappresentato da una semplice broncopolmonite apicale che potrebbe rappresentare la lesione iniziale prima dell'interessamento delle sierose e successiva evoluzione in polisierosite. Per quanto riguarda *M. hyopneumoniae*, negli allevamenti in esame è stata osservata una bassa prevalenza, con solo due aziende risultate positive. Questo è in linea con quanto descritto in letteratura, dove la polmonite enzootica viene descritta prevalentemente in animali nelle fasi di magronaggio e ingrasso (Sorensen *et al.*, 2006).

Il numero di ceppi sierotipizzati in questa fase preliminare del lavoro non permette di eseguire valutazioni sulla prevalenza dei diversi sierotipi circolanti sul nostro territorio. Tuttavia appare interessante segnalare la presenza di due ceppi identificati come sierotipo 14, isolati da suini d'importazione olandese, di cui non risultano precedenti segnalazioni in Italia (Iodice *et al.*, 2011).

I ceppi tipizzati sono tutti appartenenti a sierotipi considerati ad alta o moderata virulenza come descritto da Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992. Sulla base dei risultati di sierotipizzazione e genotipizzazione risulta, ad eccezione di un caso, che in ognuno degli allevamenti testati è presente un solo genotipo/sierotipo. Le analisi di genotipizzazione di *H. parasuis* sono state mirate alla caratterizzazione di VtaA e Omp, fattori di virulenza che ne determinano il grado di patogenicità. Relativamente alle *vtaA* i ceppi isolati da noi possedevano tutti almeno 1 *vtaA* e 3 *vtaA* associate secondo Olvera *et al.* (2011) ai ceppi virulenti. Per quanto riguarda la genotipizzazione di *ompA* mediante PCR-RFLP, i nostri risultati evidenziano i genotipi BA, CD e BD associati a patologia e non evidenziati in ceppi isolati da cavità nasali o da organi senza lesioni (Chu *et al.*, 2011). Il genotipo BB da noi isolato in un allevamento non è stato associato dagli autori a patologia, ma nello studio citato è rappresentato da soli 2 ceppi.

Il numero ridotto di ceppi considerati e l'alto numero di ceppi non tipizzabili sierologicamente non consente di evidenziare alcuna correlazione fra sierotipi e genotipi. Questo ci porta a considerare i metodi molecolari come una valida alternativa alla tipizzazione su base sierologica, quantomeno per indagini epidemiologiche. Tuttavia, la tipizzazione su base sierologica rimane per ora l'unico mezzo diagnostico 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).

La mancanza nella nostra casistica di ceppi isolati da cavità nasali o da organi di animali sani non ci permette di confermare le conclusioni degli autori cui i metodi fanno riferimento. Oltre a questo occorre considerare che i fattori di virulenza di *H. parasuis* sono molteplici e non completamente definiti e quindi ulteriori ricerche sono necessarie per identificare quei fattori in grado di differenziare chiaramente i ceppi virulenti e permettere la produzione di vaccini ad ampio spettro.

BIBLIOGRAFIA

Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004) "Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates". Vet Microbiol. 103, 255-258.

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.

Blackall P., Trott D.J., Rapp-Gabrielson V., Hampson D.J. (1997) "Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis". Vet Microbiol. 56, 125-134.

Chu Y.F., Gao P.C., Zhao P., He Y., Zhang N.Z., Liu Y.S., Liu J.X., Lu Z.X. (2011) "Genotyping of *Haemophilus parasuis* isolated from northwest China using PCR-RFLP based on the *ompA* gene". J Vet Med Sci. 73 (3), 337-43.

Dabo S.M., Confer A.W., Quijano-Blas R.A. (2003) "Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules". Microb Pathog. 35, 147-157.

Fort M., Sibila M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Mateu E., Segalés J. (2009) "One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model". Vaccine. 27, 4031-4037.

Gonyou H. W., Lemay S.P., Zhang Y. (2006) "Effects of the environment on productivity and disease". In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine", 9a ed., Oxford, Blakwell Publishing, 1027-1038.

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 disease complex in Denmark". J Comp Pathol. 143, 120-131.

Harms P.A., Halbour P.G., Sorden S.G. (2002) "Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection". J Swine Health Prod. 10, 27-30.

Iodice G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Maioli G., Dottori M., Merialdi G., Leonelli R., Merenda M., Biasi G., Luppi A. (2011) "Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati dal suino nel Nord Italia: aggiornamento dei risultati". In: XXXVII Meeting Annuale SIPAS, Piacenza, 24-25 Marzo 2011, Italia, 196-202.

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.

Kim J., Chung H.-K., Chae C. (2003) "Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex". Vet J. 166, 251-256.

Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. (2010) "Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici". In: XXXVI Meeting Annuale SIPAS, Montichiari, 25-26 Marzo 2010, Italia, 205-211.

Mattsson J.G, Bergstrom K., Wallgren P., Johansson KE. (1995) "Detection of *Mycoplasma yopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16 SrRNA gene. J. Clin. Microbiol. 33 (4), 893-897.

Oliveira S., Galina L., Pijoan C. (2001) "Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections". J of Vet Diagn Invest. 13, 495-501.

Oliveira S., Pijoan C. (2004) "*Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control". Vet Microbiol. 99, 1-12.

Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Ségales J., Domingo M. (2004) "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a Real Time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". J Virol Methods. 117, 75-80.

Olvera A., Cerda'-Cue' llar M. and Aragon V. (2006a) "Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing". Microbiology. 152, 3683-3690.

Olvera A., Calsamiglia M., and Aragon V. (2006b) "Genotypic Diversity of *Haemophilus parasuis* Field Strains". Appl Environ Microbiol. 72 (6), 3984-3992.

Olvera A., Pina S., Macedo N., Oliveira S., Aragon V., Bensaid A. (2011) "Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (*vtaA*)". Vet J. Epub. 17 Gennaio 2011.

Pavesi R., Cevidalli A., Blanchaert A., Cominotti F., Nassuato C., Boniotti B., Alborali L. (2011) "Profilo sierologico e virologico dell'infezione da PCV-2 e PRRSV in 10 allevamenti suini italiani". In: XXVII Meeting Annuale SIPAS, Piacenza, 24-25 Marzo 2011, Italia, 342-350.

Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., Kim K.S. (1996) "Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells". Infect Immun. 64, 146-153.

Rafiee M., Bara M., Stephens C. P., Blackall P.J. (2000) "Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*". Aust. Vet. J. 78, 846-849.

Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992) "Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine". Am J Vet Res. 53, 659-664.

Smith S.G., Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P. (2007) "A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression". FEMS Microbiol Lett. 273 (1), 1-11.

Sorensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006) "Diseases of the respiratory system". In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine", 9a ed., Oxford, Blakwell Publishing, 149-177.

Thacker E.L. (2001) "Immunology of the respiratory disease complex". Vet Clin North Am Food Anim Pract. 17, 551-565.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche sono state eseguite con il contributo del Progetto Regione Lombardia 2009 RELOPROZOO.

Si ringrazia la sig.ra Sala Lorenza per il competente supporto tecnico nello svolgimento delle analisi molecolari.