

DINAMICA D'INFEZIONE DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES AVIUM IN UN ALLEVAMENTO SUINO A GESTIONE MULTISITO

PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES AVIUM IN A SWINE MULTISITE HERD

ZOPPI, S.¹, VITALE, N.¹, D'ERRICO, V.¹, GIORGI, I.¹, PEROSINO, M.¹, SONA, B.²,
CHIAVACCI, L.¹, BARICCO, G.³, DONDO, A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;

²Servizio Veterinario ASL CN; ³Libero Professionista Torino

Parole chiave: studio multilivello, tubercolosi suina, prevalenza, *Mycobacterium avium* subspecies *avium*

Key Words: multilevel study, swine tuberculosis, prevalence, *Mycobacterium avium* subspecies *avium*

RIASSUNTO: *Mycobacterium avium* subspecies *avium* causa infezioni solitamente a decorso asintomatico nel suino, tuttavia può essere collegato a gravi forme morbose che possono essere responsabili di ingenti perdite in sede di macellazione. Recentemente sono stati condotti studi sperimentali mirati all'individuazione di test sierologici di ausilio alla diagnosi *in vita* dell'infezione che presentavano il limite di essere applicati su soggetti infettati sperimentalmente. In un allevamento endemicamente infetto è stato possibile definire, utilizzando uno studio multilivello, la dinamica dell'infezione e individuare i punti critici dove poter concentrare le azioni correttive: la sieroprevalenza aumentava all'aumentare dell'età dei soggetti (0% a 2,5 mesi, 10% a 6 mesi, 50% a 9 mesi, oltre il 90% dopo i 2 anni di età) e non era influenzata dalla tipologia produttiva. Il test sierologico pertanto può essere utilizzato come test di screening dei soggetti destinati alla riproduzione se associato ad una corretta gestione igienico-sanitaria delle sale-parto e dello svezzamento.

ABSTRACT: *Mycobacterium avium* subspecies *avium* infection in swine usually occurs symptomless, but it could be linked to severe forms associated with serious losses at the slaughter. Recently, several studies, applied only on experimentally infected pigs, have been focused on the identification of serological tests aimed to the "*in vita*" diagnosis of MAA infection. As it usually occurs when studying a disease experimentally reproduced, those field conditions necessary to fully understand the dynamics of infection are missing. Our goal was to fill this gap by a multilevel study in order to define the dynamics of infection and to identify critical points for corrective actions. It was observed that the seroprevalence increased with increasing age of the subjects (0% 2, 5 months old, 10% at 6 months old, 50% at 9 months old, more than 90% after 2 years old) and it was not influenced by the type of production (breeding vs fattening). The ELISA test could therefore be used as a screening test for gilts selection when combined with proper hygienic procedures in particular concerning of farrowing and weaning sites.

INTRODUZIONE

Mycobacterium avium subsp. *avium* (MAA) e *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

(MAH) sono membri del *Mycobacterium avium* Complex (MAC), sono largamente presenti nell'ambiente e sono stati isolati da varie specie animali (Biet F. *et al*, 2005). MAA, caratterizzato dalla presenza della sequenza d'inserzione IS901+, è un patogeno primario dei volatili ed è comunemente isolato da animali domestici, ma raramente dall'uomo (Stepanova H. *et al*, 2012).

MAH, essendo invece un patogeno opportunista, ha una larga diffusione ambientale e un ampio spettro d'ospite; è stato isolato più frequentemente nei suini e nell'uomo (Tirkkonen T. *et al*, 2007).

In termini generali, si è però osservato che MAA e MAH possono essere responsabili di gravi infezioni sistemiche in pazienti umani immunocompromessi, come accade in soggetti affetti da HIV (Agdestein A. *et al*, 2012; Slana I. *et al*., 2010).

Nel suino, l'infezione da MAA/MAH decorre usualmente in forma asintomatica, ma può essere fonte di perdite economiche per l'allevatore per gli scarti di carcasse in sede di macellazione.

Recentemente sono stati condotti studi su suidi domestici (Stepanova H. *et al*, 2011) e selvatici (Garrido J.M. *et al*, 2010) che hanno cercato di valutare, utilizzando l'infezione sperimentale, l'andamento della risposta immunitaria nei confronti di MAC sia di tipo anticorpale che di tipo cellulo-mediata.

Stepanova *e coll.* (2012) hanno evidenziato che i suini infetti da MAH mostrano una bassa risposta sia anticorpale che cellulo-mediata, mentre MAA determina una significativa risposta immunitaria con picchi anticorpali a 14 settimane dall'infezione e stabili per il tempo di osservazione (fino a 24 settimane post infezione).

Di conseguenza, il ricorso ad indagini sierologiche *in vita* potrebbe garantire il controllo e la gestione del problema in sede di allevamento, ma tali studi sono sperimentali e monitorano per tempi limitati i suini infetti e mancano in bibliografia indagini condotte in corso di infezione naturale. Inoltre, l'interesse scientifico è limitato nei confronti di MAA rispetto a MAH, in quanto il riscontro di MAA nel suino riguarda solo il 10-20% di tutti i casi di infezione da MAC (Shitaye *et al*, 2006; Domingos *et al*, 2009) e recentemente MAH è stato riconosciuto agente abortigeno e responsabile di infertilità nella scrofa (Eisenberg T. *et al*, 2012). Tuttavia, è stato osservato recentemente (Zoppi S. *et al*, 2012) che anche MAA è in grado di insediarsi, permanere in allevamento e causare gravi forme morbose e scarti di intere carcasse alla macellazione oltre che dare lesioni croniche a livello renale (Varello K. *et al*, 2012).

L'obiettivo di questo progetto è pertanto quello di valutare il trend sierologico dell'infezione mettendo a confronto le diverse tipologie produttive, la localizzazione geografica di ogni sito e l'età degli animali, in modo da definire la dinamica dell'infezione nell'allevamento e individuare i punti critici dove poter concentrare le azioni correttive per migliorare la comprensione dei fattori di diffusione della malattia e contenere le perdite economiche in azienda.

MATERIALI E METODI

Allevamento e Animali

L'oggetto dello studio è un allevamento a ciclo aperto a gestione multisito (Tabella 1) con annesso mangimificio, che provvede all'alimentazione di tutti i settori produttivi (scrofaia, post-svezzamento e ingrasso) già sottoposto a segnalazione dell'infezione da MAA (Zoppi S. *et al*, 2012). Si distinguono: scrofaia (circa 2800 scrofe di cui 600 primipare e 2200 pluripare, con 60000 svezzati all'anno), due siti di post-svezzamento (SITO 2) e 9 siti di ingrasso. L'età di macellazione è compresa tra i 9 e 10 mesi.

COD ALLEV	comune	PRODUZIONE	n. capannoni	n. animali
1 A	A	post svezz	10	400 ciascuno
2 A	A	ingrasso	20	400 ciascuno
13 B	B	post svezz	8	1500 ciascuno
3 C	C	ingrasso	1	800
4 C	C	ingrasso	2	1100+400
10 D	D	scrofaia	3	1500+700+450
5 D	D	ingrasso	eliminato	
6 D	D	ingrasso	5	250+550+550+550+550
7 D	D	ingrasso	2	1000+1000
8 D	D	ingrasso	2	750+750
9 D	D	ingrasso	5	500+1250+1250+1250+1250
12 E	E	ingrasso	2	1000+500
11 E	E	ingrasso	4	500+500+500+500

Tabella 1: struttura e consistenza dell'allevamento sottoposto a controllo per MAA.

Table 1: management, structure and housing capacity in the swine herd monitored for MAA infection.

Campionamento

Per completezza di indagine, sono stati presi in considerazione anche i campioni prelevati precedentemente da scrofe (n. 59 animali) e scrofette (n. 30 animali) e inclusi nello studio condotto da Zoppi S. *et al* (2012).

Tra il 13/03/2012 e il 17/05/2012 sono stati effettuati prelievi ematici a campione sull'effettivo dell'allevamento (settore post-svezzamento e ingrasso) secondo quanto pianificato e riportato in Tabella 2. Dopo circa 4-5 mesi (30/07/2012 e 17/08/2012) sono stati controllati a campione 15 animali di circa 1 mese, 15 animali di circa 2-3 mesi, 12 animali di 6 mesi (scrofette) e 26 animali di oltre 9 mesi di età (scrofe) del settore riproduzione.

comune	categoria animali	codice	capi	capannoni	prelievo/capannone
A	post svezzamento	1A	12 (24)	2	12 capi
	ingrasso	2A	24 (36)	3	12 capi
B	post svezzamento	13B	36	3	12 capi
C	ingrasso	3C	12	1	12 capi
	ingrasso	4C	24	2	12 capi
D	ingrasso	7D	24	2	12 capi
	ingrasso	8D	12 (24)	2	12 capi
	scrofaia	10D	39 (45)	3	15 capi
	ingrasso	6D	36	3	12 capi
	ingrasso	9D	36	3	12 capi
	ingrasso	5D	eliminato		
E	ingrasso	12E	24	2	12 capi
	ingrasso	11E	36	3	12 capi
Totale			315 (357)		

Tabella 2: campionamento sierologico previsto distribuito per settore produttivo e per sito di allevamento. [tra parentesi il numero di prelievi da eseguire e in grassetto quelli eseguiti].

Table 2: serological sampling procedure based on herd site and type of production (fattening, breeding, post-weaning). [minimum samples required in brackets and effective samples in bold].

Esame sierologico

I campioni di sangue prelevati a campione da ciascun sito di allevamento sono stati analizzati utilizzando un kit ELISA del commercio specifico per *M. avium* (PrioCHECK® *M. avium* Ab porcine, Prionics AG, Switzerland).

Le modalità di esecuzione e i criteri interpretativi sono quelli indicati dalla ditta produttrice.

Analisi statistiche

I dati sierologici sono stati sintetizzati attraverso tabelle e grafici. Per valutare l'associazione tra la positività sierologica ed i seguenti fattori: età dei capi, categoria produttiva, comune, mese è stato eseguito il test statistico chi quadrato. La probabilità di osservare dei positivi al test sierologico data la presenza di uno o più dei fattori considerati è stata stimata attraverso un modello di regressione logistica. Sono stati calcolati gli odds ratio (OR) aggiustati per tutti i fattori considerati. Per le elaborazioni statistiche è stato utilizzato il software SAS@v9.2.

RISULTATI

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti al test ELISA. Tutti i fattori di analisi sono stati rappresentati: sito allevamento, categoria produttiva (ingrasso, scrofaia, post svezzamento) e distribuzione del campione per capannoni.

I risultati del test statistico chi quadrato evidenziano l'associazione tra test sierologici e tutti e quattro i fattori considerati: comune, età, mese e categoria produttiva.

Comune	ID allevamento	Categoria produttiva	età animali (mesi)	Data Prelievo	Esito test ELISA				
					D	N	P	TOT	POS (%)
A	1A	ingrasso	6	18/04/2012		12		12	0%
		post svezzamento	tra 2 e 4	18/04/2012		24		24	0%
B	13B	post svezzamento	tra 2 e 4	18/04/2012		36		36	0%
C	3C	ingrasso	9	12/03/2012	2	6	4	12	50,0%
	4C	ingrasso	7	12/03/2012	5	15	4	24	37,5%
D	10D	post svezzamento**	2 - 3	13/08/2012		15		15	0%
		scrofaia	oltre 24	*(Zoppi S. et al., 2012)		3	56	59	94,9%
		scrofaia	oltre 9	30/07/2012	5	1	21	27	96,3%
		scrofaia	6	*(Zoppi S. et al., 2012)		17	13	30	43,3%
		scrofaia	6	30/07/2012	5	5	2	12	58,3%
		suinetti sottoscrofa**	1	13/08/2012	1	11	3	15	26,7%
	6D	ingrasso	tra 7 e 9	15/05/2012	2	10		12	16,7%
			tra 8 e 9	15/05/2012	7	17		24	29,2%
	7D	ingrasso	6	20/03/2012	3	20	1	24	16,7%
	8D	ingrasso	9	15/05/2012	4	6	2	12	50,0%
9D	ingrasso	9	20/03/2012	13	20	3	36	44,4%	
E	12E	post svezzamento	tra 2 e 4	27/03/2012	2	21	1	24	12,5%
	11E	ingrasso	tra 7 e 9	27/03/2012	7	27	2	36	25,0%
Totale complessivo					56	246	43	434	22,8%

Tabella 5: esiti del test ELISA suddivisi per comune, allevamento, età degli animali, data di prelievo, positività. [*Sono stati inclusi anche esami precedentemente eseguiti e inclusi in altro studio (Zoppi S. et al., 2012); **analisi supplementari su scrofaia].

Table 5: ELISA test results classified according to site, herd, animal age, sampling date, positivity. [*Test results previously performed and already published (Zoppi S. et al., 2012) are included; **supplementary analysis on sows/gilts].

I risultati del modello di regressione logistica sono mostrati in Tabella 4: i fattori che sono associati alla positività sierologica sono l'età e la categoria produttiva ingrasso.

Sulla base dei risultati ottenuti, considerando esclusivamente il fattore età, si osserva un aumentare della positività sierologica all'aumentare dell'età in tutte le categorie di animali (Figura 1).

Stime degli odds ratio (OR)			
Effetto	Stima puntuale	Limiti di confidenza di Wald al 95%	
INGRASSO	7.201	2.936	17.663
ETA'	1.957	1.639	2.337

Tabella 4: stima degli odds ratio (OR) dei fattori considerati: ingrasso ed età.

Table 4: odds ratio evaluation according to defined factors: fattening and age.

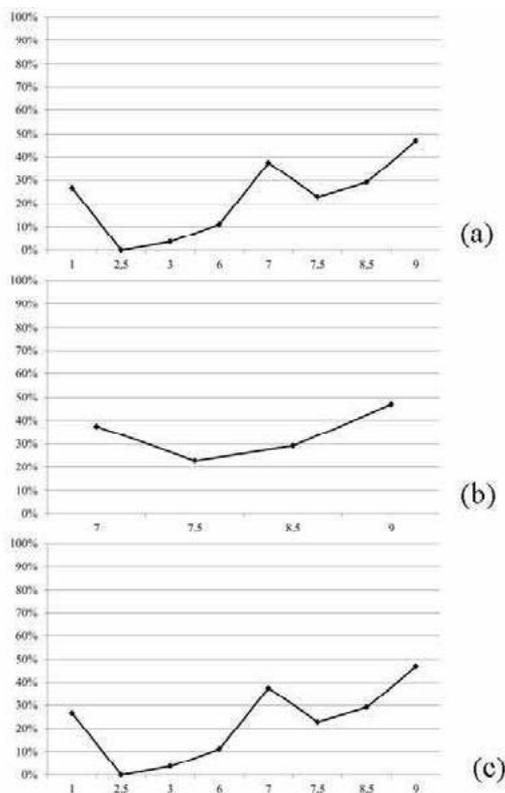


Figura 1: percentuali di positività per età degli animali (espressa in mesi) in tutte le categorie (a), nella scrofaia (b) e nel post svezzamento/ingrasso (c).

Figure 1: positivity rate (%) expressed for age (in month) considering all of categories (a), gilts/sows (b) and post-weaning/fattening (c).

DISCUSSIONE

Dalle indagini pilota la siero-prevalenza attesa all'interno dei siti era molto alta e variava in base all'età e categoria dei capi (Zoppi S. *et al.*, 2012): i dati del presente studio confermano quanto precedentemente osservato.

La positività riscontrata nei suinetti appena svezzati indica una circolazione nella popolazione di anticorpi di origine materna, che scompaiono a partire dal secondo mese di età. Questo dato rafforzerebbe la tesi sostenuta ovvero che l'infezione avvenga nel periodo di stabulazione nella sala parto con conseguente sviluppo di immunità specifica a partire dal terzo mese di età (Stepanova H *et al.*, 2012).

La fonte di infezione sarebbe da individuare nelle lesioni croniche e attive del tratto genito-urinario delle scrofe, in quanto già dimostrata la presenza di tali lesioni in suini regolarmente macellati (Varello K. *et al.*, 2012).

L'eliminazione fecale di MAA in studi di infezione sperimentale è controversa: in alcuni si sostiene che sia presente ma limitata nel tempo (Stepanova H. *et al.*, 2012), in altri casi che sia del tutto assente (Agdestein, A *et al.*, 2012). Nell'allevamento oggetto di studio, la possibilità che si verifichi in ogni caso un'eliminazione fecale transitoria di MAA da parte dei suinetti aumenterebbe la probabilità che l'infezione venga contratta anche da suinetti nati da scrofe "free" al momento del pareggiamento delle nidiate, ma non influirebbe sulle nidiate già contaminate perchè nate da madri infette.

Del tutto esclusa in questo caso, visto l'elevato numero di animali coinvolti, l'ipotesi sostenuta da alcuni autori circa l'infezione individuale determinata dal consumo di materiale contaminato da feci di volatili (Pavlik I. *et al.*, 2000).

CONCLUSIONI

La siero prevalenza media verso MAA osservata nell'allevamento oggetto di studio si attesta attorno al 22-23%, con punte massime nella scrofaia superiori al 90%. Le azioni correttive individuate e attuabili al momento sono in particolare mirate al contenimento della carica infettante e degli effetti collaterali legati all'infezione (scarti alla macellazione); infatti, in un contesto epidemiologico intra-allevamento di questo tipo non è attuabile un programma di eradicazione dell'infezione.

I dati ottenuti confermano che il settore ingrasso è il reparto produttivo maggiormente colpito dall'infezione, pertanto la pianificata eliminazione del centro ingrasso annesso alla scrofaia è da ritenersi un'azione correttiva migliorativa non solo in termini di biosicurezza generale, ma anche specifica per la diminuzione della pressione infettiva esercitata dai soggetti all'ingrasso.

I test *in vita* specifici per la diagnosi sierologica di MAA possono essere un utile strumento come screening per la scelta dei capi da destinare alla riproduzione se associato ad una corretta gestione igienico-sanitaria delle sale parto e dello svezzamento.

In seguito ai controlli eseguiti, la scelta del proprietario è stata invece più radicale e mirata al rinnovo graduale del parco scrofe contestuale al rafforzamento del trattamento antiparassitario per il controllo sugli animali all'ingrasso degli ascaridi (doppio trattamento con levamisolo 20% al ristallo e dopo 15 giorni – 100Kg), identificati come causa potenziale del passaggio extra-intestinale di MAA e della generalizzazione delle lesioni.

Il processo di rinnovamento del parco scrofe è stato completato recentemente e pertanto sarà possibile valutare l'efficacia di tale operazione con i prossimi dati riferiti alla macellazione delle partite nate dalle nuove scrofe.

BIBLIOGRAFIA

- Agdestein, A., Johansen, T.B., Kolbjørnsen, Ø., Jørgensen, A., Djønnø, B., Olsen, I. (2012). “A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs”. BMC Veterinary Research 8:11. doi:10.1186/1746-6148-8-11.
- Biet, F., Boschirolì, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. (2005). “Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)”. Vet. Res. 36, 411–436.
- Domingos M., Amado, A., Botelho, A. (2009) “IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal” Vet Rec 164(4), 116-120.
- Eisenberg, T., Volmer, R., Eskens, U., Moser, I., Nessler, A., Sauerwald, C., Seeger, H., Klewer-Fromentin, K., Möbius, P. (2012). “Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*”. Vet. Microbiol. 159, 69–76.
- Garrido, J.M., Vicente, J., Carrasco-Garcia, R., Galindo, R.C., Minguijón, E., Ballesteros, C., Aranaz, A., Romero, B., Sevilla, I., Juste, R., de la Fuente, J., Gortazar, C. (2010). “Experimental infection of Eurasian wild boar with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*”. Vet. Microbiol. 144, 240–245.
- Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., Dvorska, L., Rychlik, I. (2000). “Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry”. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 212-217.
- Shitaye, J.E., Parmova, I., Matlova, L., Dvorska, L., Horvathova, A., Vrbas, V., Pavlik, I. (2006). “Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues”. Vet. Med. – Czech 51, 497–511.
- Slana, I., Kaevska, M., Kralik, P., Horvathova, A., Pavlik, I. (2010). “Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR”. Vet. Microbiol. 144, 437-443.
- Stepanova H., Pavlova B., Stromerova N., Ondrackova P., Stejskal K., Slana I., Zdrahal Z., Pavlik I., Faldyn M. (2012). “Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection”. Vet. Microbiol. 159, 343-350.
- Stepanova, H., Pavlova, B., Stromerova, N., Matiasovic, J., Kaevska, M., Pavlik, I., Faldyna, M. (2011). “Cell-mediated immune response in swine infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*”. Vet. Immunol. Immunopathol. 142, 107–112.
- Thegerström, J., Marklund, B.I., Hoffner, S., Axelsson-Olsson, D., Kauppinen, J., Olsen, B. (2005). “*Mycobacterium avium* with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely in humans”. Scand. J. Infect. Dis. 37, 15–20.
- Tirkkonen, T., Pakarinen, J., Moisander, M., Mäkinen, J., Soinid, H., Ali-Vehmasb, T. (2007) “High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis” Vet. Microbiol. 125, 175–181.
- Varello, K., Dondo, A., Richelmi, G., Bozzetta, E., Perosino, M., D’Errico, V., Gorìa, M., Giorgi, I., Zoppi, S. (2012). “Lesioni renali da *Mycobacterium avium* subspecies *avium* nel suino: aspetti anatomo-istopatologicic e significato diagnostico”. XIV Congresso

- Nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento (NA) 24-26 Ottobre 2012, 506-509.
- Wallenberg, G.J., de Haas, P.E., van Ingen, J., van Soolingen, D., Visser, I.J. (2010). "Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs". Vet. Rec. 167, 451-454.
 - Zoppi, S., Garrone, A., Rossi, F., Ferraro, G., Sona, B., Giorgi, I., Goria, M., Tron, S., D'Errico, V., Alborali, G., Zanoni, M.G., Dondo, A., Baricco, G. (2012). "*Mycobacterium avium* subsp. *avium*: forme generalizzate di tubercolosi aviare in un allevamento suino a gestione multisito". XXXVIII Meeting Annuale S.I.P.A.S., Parma 22-23 Marzo 2012, 142-151