

IMPIEGO DELLA VACCINAZIONE NELLE SCROFE PER IL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI GLÄSSER

THE GLÄSSER DISEASE CONTROL USING THE VACCINATION IN SOWS

BIASI G.¹, CAVALLARI M.², BONILAURI P.¹, ROSAMILIA A.¹, MAIOLI G.¹,
GHERPELLI Y.¹, DOTTORI M.¹, LUPPI A.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

²*Dottore Agronomo*

Parole chiave: *Haemophilus parasuis*, suino, sierotipizzazione, vaccinazione

Key words: *Haemophilus parasuis*, pig, serotyping, vaccination

Riassunto

Un focolaio di polisierosite ha colpito, nei mesi di gennaio e febbraio 2012, un allevamento multisito di 1400 scrofe, situato in nord Italia. Il 50% dei suinetti di 28 giorni d'età ha manifestato febbre alta (41,5 °C), tosse, respiro addominale, gonfiore articolare con zoppia e sintomi nervosi (decubito laterale, pedalamento e tremori) con un tasso di mortalità del 20% circa. Cinque suinetti sottoposti a necropsia e ad esame anatomopatologico hanno evidenziato quadri riferibili a malattia di Glässer (polisierosite, artrite fibrinosa, meningite). Da campioni patologici raccolti durante l'esame anatomopatologico è stato isolato un ceppo di *Haemophilus parasuis* successivamente sierotipizzato, tramite AGID, come sierotipo 13. Il ceppo isolato è stato utilizzato per la produzione di un vaccino stabulogeno. Le scrofe sono state vaccinate due volte ad intervallo di 28 giorni e le scrofette a 115 e 140 giorni di vita. Tutte le scrofe e le scrofette sono state rivaccinate a 77 giorni di gestazione. Dall'introduzione della vaccinazione non sono stati riportati casi di polisierosite in allevamento.

Abstract

During January and February 2012 an outbreak of polyserositis occurred in a 1400 sows multisite herd of northern Italy. A large number of piglets (50%) 28 days old showed high fever (41,5°C), coughing, abdominal breathing, swollen joints with lameness and central nervous signs (lateral decubitus, paddling and trembling) and the piglets mortality was approximately 20%. Necropsies performed on 5 piglets showed lesions compatible with a diagnosis of Glässer disease (polyserositis, fibrinous arthritis and meningitis). A strain of *Haemophilus parasuis* identified as serotype 13 was isolated from samples collected during the necropsies. The strain isolated was used to produce an autovaccine and sows were firstly vaccinated twice with an interval of 28 days and gilts were vaccinated at 115 and 140 day of life. All sows and gilts were then revaccinated at 77 days of gestation. After the introduction of the vaccination no cases of Glässer disease were recorded in the herd.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è l'agente eziologico della malattia di Glässer, patologia caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente. Batterio cosmopolita, si presenta come coccobacillo Gram -, anaerobio facoltativo, immobile, non emolitico e dotato di spiccato polimorfismo. Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento degli "stressors" e il concomitante sviluppo di patogeni "door opener"

come il PRRSV hanno fatto sì che *H. parasuis* si ripresentasse come problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari. A tutt'oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H. parasuis* che presentano prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, analizzando studi di sierotipizzazione dei ceppi isolati, eseguiti in diversi Paesi Europei, si può osservare come i sierotipi 4, 5 e 13 risultino essere quelli prevalenti, mentre altri sierotipi come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrino prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Angen et al. 2004). I 15 sierotipi di *H. parasuis* sono stati classificati in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Kielstein P. and Rapp-Gabrielson V.J., 1992). Nel primo gruppo sono stati classificati i sierotipi 1, 5, 10, 12, 13 e 14 che provocano forme cliniche acute caratterizzate da alta mortalità e morte in 96 ore. Nel secondo gruppo ritroviamo i sierotipi 2, 4 e 15 che provocano, invece, la cosiddetta forma sistemica, caratterizzata da polisierosite, con una mortalità bassa o assente. Nel terzo gruppo è presente il solo sierotipo 8 che si limita a provocare lievi sintomi e lesioni. Infine, al quarto gruppo, appartengono i sierotipi 3, 6, 7, 9 e 11 considerati commensali delle prime vie respiratorie, che non provocano quindi né sintomatologia clinica né lesioni. In condizioni di campo, tuttavia, i quadri clinici ed anatomopatologici provocati da un determinato sierotipo possono subire importanti variazioni. Questo si verifica perché *H. parasuis* può sovrapporsi ad infezioni virali come germe d'irruzione secondaria ovvero essere concomitante ad altre infezioni batteriche o ancora essere presente in un focolaio di malattia con più sierotipi. La colonizzazione da parte di *H. parasuis* inizia quando i suinetti sono ancora protetti dall'immunità passiva materna, la quale influenza in modo diretto la sensibilità delle nidiate a sviluppare la malattia. Quando l'equilibrio tra batterio ed immunità viene ad essere alterato da errate pratiche gestionali e da altri fattori come ad esempio lo stato immunitario dei suinetti, la presenza contemporanea di altri patogeni come PRRSV o PCV2, la virulenza dei ceppi di *H. parasuis* presenti o l'introduzione di nuovi sierotipi, si ha lo sviluppo della malattia (Aragon et al., 2012). L'immunità protettiva è legata allo sviluppo di anticorpi dopo infezione o vaccinazione e in quest'ultimo caso la completa protezione è ottenuta con l'impiego di vaccino omologo. La diversità antigenica tra i diversi sierotipi è un limite alla possibilità di avere vaccini realmente efficaci in termini di cross-protezione. Da quanto sopra esposto si sottolinea l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* sia per studi di prevalenza, sia 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*. Nel presente lavoro è descritto un caso clinico caratterizzato da ripetuti focolai di malattia di Glässer in un allevamento suino del nord Italia, focalizzando la trattazione principalmente sulle misure approntate per la risoluzione del problema sanitario.

MATERIALI E METODI

Il focolaio di malattia di Glässer, di seguito descritto, ha coinvolto un allevamento multisito, costituito da 1400 scrofe, con svezzamento dei suinetti a 21 giorni. L'allevamento era positivo a PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e PCV2. Il piano vaccinale nei suinetti prevedeva un solo intervento per Mhyo e PCV2 a tre settimane e successivamente per *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) e malattia di Aujeszky (PRV) a 70 e 100 giorni di vita. Una terza vaccinazione per PRV veniva fatta a 190 giorni. Le scrofe erano vaccinate per rinite atrofica a 70 e 90 giorni di gestazione, per parvovirus ed *Erysipelothrix rhusiopathiae* ogni 4 mesi e tre volte per PRV a 70, 100 e 160 giorni. L'allevamento eseguiva rimonta interna ed impiegava, per l'inseminazione delle scrofe, seme prodotto in allevamento. Le strutture dedicate alla gestazione presentavano ventilazione naturale, mentre nel sito 2 la ventilazione era forzata. Nelle sale

parto veniva effettuato il tutto pieno-tutto vuoto, dove veniva praticata una regolare pulizia e disinfezione tra i lotti. Tra gennaio e febbraio 2012, in un'elevata percentuale di suinetti (50%) di 28 giorni d'età, presenti in differenti box, si osservava febbre alta (41,5 °C), tosse, respiro addominale, gonfiore articolare, zoppia e sintomi nervosi (decubito laterale, pedalamento e tremori). Il 70% dei suinetti, presentante i segni clinici sopra descritti, proveniva da nidiate di scrofe primipare. La mortalità osservata nei suinetti nel corso del focolaio, si aggirava intorno al 20% e i sintomi descritti comparivano in concomitanza a viremie da virus della PRRS. Cinque suinetti clinici, sono stati sacrificati per garantire l'elevata qualità del materiale patologico da sottoporre ad esame batteriologico presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Sulla base dei rilievi anatomopatologici, eseguiti sui suinetti sopraccitati, sono state condotte le indagini di laboratorio ritenute più opportune, seguendo i protocolli standardizzati presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione di Reggio nell'Emilia. In particolare, in presenza di quadri macroscopici compatibili con una diagnosi di malattia di Glässer, è stato applicato il protocollo diagnostico di seguito descritto. Il materiale patologico costituito da polmoni, tamponi bronchiali, tamponi da liquido pericardico e da liquido cefalorachidiano e prelievi di liquido sinoviale, sono stati utilizzati per la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con nicotinamide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere la crescita di quei patogeni che, come l'*H. parasuis* sono NAD dipendenti. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner ed in termostato a CO₂ per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione la crescita di *H. parasuis* è stata confermata tramite test morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica su agar sangue addizionato con NAD e al microscopia ottico dopo colorazione di Gram) e biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti, catalasi positive, ureasi negative e indolo positive).

RISULTATI

I quadri macroscopici osservati durante le necrosopie erano caratterizzati da polisierosite fibrinosa (peritonite, pleurite e pericardite fibrinose), broncopolmonite catarrale ai lobi apicali, presenza di petecchie emorragiche in diversi organi (rene, fegato e polmone) e quadri di linfadenomegalia generalizzata. Dal materiale patologico prelevato durante l'attività necroscopica sono state eseguite indagini batteriologiche, come riportato precedentemente. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, le piastre sono state esaminate per valutare l'eventuale crescita batterica. Dopo 48 ore di incubazione piccole colonie di colore grigio-bruno, traslucide, non emolitiche sono comparse su agar sangue addizionato con NAD da polmone (3/5), dagli essudati bronchiali (3/5), da tampone pericardico (2/5), da tampone cerebrale (2/5) e da essudato articolare (2/5). Le colonie batteriche isolate Gram -, pleomorfe, NAD dipendenti, catalasi positive, ureasi negative e indolo positive sono state identificate come *H. parasuis*. La suscettibilità antibiotica degli isolati è stata determinata mediante una metodica di microdiluzione con kit commerciale a 96 pozzetti. Gli antimicrobici testati e il loro range di diluizione sono rispettivamente: penicillina (PEN) 0.12-8 mg/ml; ampicillina (AMP), 0.25-8 mg/ml; ceftiofur (XNL), 0.25-8 mg/ml; gentamicina (GEN), 1-16 mg/ml; neomicina (NEO), 4-32 mg/ml; spectinomomicina (SPE), 8-64 mg/ml; ossitettraciclina (OXY), 0.5-8 mg/ml; tilmicosina (TIL), 4-32 mg/ml; enrofloxacin (ENRO), 0.12-2 mg/ml; florfenicolo (FFC), 0.25-8 mg/ml; tiamulina (TIA), 1-32 mg/ml e trimetoprim/sulfametossazolo (COT), 0.5/9.5-2/38 mg/ml. L'interpretazione dei risultati ha previsto l'utilizzo dei breakpoints indicati da Aaerstrup et al. (2004) (PEN, AMP, XNL, SPE, TIL, FFC, TIA E COT), dal CLSI (2004) per *A. pleuropneumoniae* o *Histophilus somni* (OXY, GEN e ENRO) e da CASFM (2011) (NEO). I risultati della sensibilità antimicrobica sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Suscettibilità antimicrobica del ceppo di *H. parasuis* isolato. I risultati sono stati ottenuti usando un metodo di microdiluzione.

Table1. Antimicrobial susceptibility of the strain of *H. parasuis* isolated. The test was performed using a microdilution method.

Antimicrobico		MIC breakpoints (µg/ml)		Risultati
		S	R	
PEN	Penicillina	≤ 2	≥ 4	R
AMP	Ampicillina	≤ 2	≥ 4	R
XNL	Ceftiofur	≤ 2	≥ 4	S
SPE	Spectinomicina	≤ 32	≥ 128	R
TIL	Tilmicosina	≤ 8	≥ 32	S
FFC	Florfenicolo	≤ 2	≥ 8	S
TIA	Tiamulina	≤ 16	≥ 32	S
COT	Trimetoprim/sulfametossazolo	≤ 2	≥ 4	S
GEN	Gentamicina	≤ 4	≥ 16	R
NEO	Neomicina	≤ 8	≥ 16	R
ENRO	Enrofloxacin	≤ 0.25	≥ 2	S

I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati tipizzati tramite AGID e sono risultati appartenere al sierotipo 13. I suinetti sono stati trattati utilizzando trimetoprim/sulfametossazolo e florfenicolo con lo scopo di controllare la problematica sanitaria, ottenendo una riduzione della mortalità. Tuttavia, numerosi focolai di polisierosite presentanti caratteri sovrapponibili, con quanto descritto precedentemente, sono stati registrati nel corso della primavera successiva. Valutazioni di tipo epidemiologico, clinico ed economico hanno portato a considerare l'introduzione della vaccinazione nei confronti di *H. parasuis* impiegando un vaccino stabulogeno allestito presso l'IZSLER con il ceppo isolato in allevamento, essendo il sierotipo 13 non incluso nei vaccini in commercio. Il protocollo vaccinale ha previsto che gli interventi vaccinali nelle scrofe venissero effettuati con un intervallo di 28 giorni tra un intervento e quello successivo mentre le scrofette sono state vaccinate a 115 e 140 giorni di vita. Tutte le scrofe e le scrofette sono state quindi sottoposte a richiamo prima del parto a 77 giorni di gestazione. La mortalità dei suinetti nel post svezzamento dopo l'introduzione della vaccinazione si è mantenuta intorno al 2 % e nessun focolaio di polisierosite è stato riportato nell'allevamento fino ad oggi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il caso clinico riportato descrive un focolaio causato da *H. parasuis*, l'iter diagnostico e la gestione della problematica sanitaria fino alla sua risoluzione. La gravità del caso clinico descritto ed il suo carattere ricorrente è probabilmente legato alla virulenza del ceppo di *H. parasuis*, che come descritto in precedenza, è risultato appartenere al sierotipo 13, il secondo sierotipo in Italia dopo il sierotipo 4, in termini di prevalenza (Luppi et al., 2012). Non è possibile escludere o confermare se il ceppo di *H. parasuis* isolato costituisca una nuova introduzione in allevamento perché non sono disponibili precedenti dati riguardanti altri focolai di polisierosite o l'isolamento di *H. parasuis*. Il ceppo isolato presentava resistenza a penicillina, ampicillina, streptomina, neomicina e gentamicina. La multiresistenza tra ceppi

di *H. parasuis* stata descritta in paesi come Spagna e Cina mentre un'elevata percentuale di sensibilità agli antimicrobici viene registrata in Danimarca e Inghilterra (Aarestrup et al., 2004; Martin de la Fuente et al., 2007; Zhou et al., 2010). Queste differenze in termini di sensibilità agli antibiotici sarebbero correlabili ad un maggior utilizzo di molecole antibatteriche dove i fenomeni di resistenza risultano in aumento. L'utilizzo della terapia antibiotica nel caso sopra riportato pur sortendo effetti positivi in termini di riduzione della sintomatologia clinica e della mortalità, non ha permesso il completo controllo dei focolai che si sono susseguiti nei suini svezzati intorno a 28 giorni d'età anche nei mesi successivi al primo focolaio. In seguito al protrarsi del problema è maturata la necessità di intraprendere due strade: lo spostamento dei suinetti di 6 kg in allevamenti sito 2 gestiti in tutto pieno – tutto vuoto e, contemporaneamente, l'introduzione della profilassi vaccinale e più nello specifico di utilizzare un vaccino stabulogeno prodotto con il ceppo isolato in allevamento. Nel caso descritto non è stato utilizzato il vaccino del commercio, contenente i sierotipi 4 e 5 e pertanto non possono essere espresse valutazioni sulla possibile protezione di questo nei confronti del ceppo eterologo (sierotipo 13) isolato in allevamento. Dati raccolti dalla letteratura indicano come il sierotipo 4 sia protettivo nei confronti di infezioni con il sierotipo sia omologo, sia eterologo (sierotipo 5). L'impiego di un vaccino bivalente contenente i sierotipi 4 e 5 sarebbe in grado di ridurre significativamente le lesioni causate da infezioni di ceppi di *H. parasuis* appartenenti ai sierotipi 13 e 14 fornendo quindi almeno una parziale protezione immunitaria (Aragon et al., 2012). Ritornando al caso descritto nel presente lavoro, il vaccino stabulogeno prodotto è stato quindi impiegato con una strategia basata sulla vaccinazione di scrofe e scrofette e conseguente trasmissione di una solida immunità materna ai suinetti nati da queste, oltretutto la gestione degli allevamenti sito 2 ha permesso di ridurre la carica batterica in scrofaia e ha evitato la trasmissione diretta tra suini di età differenti. Studi condotti sulla protezione dell'immunità passiva materna, nei confronti della malattia, hanno dimostrato come suinetti infettati da ceppi virulenti in presenza di una solida immunità materna siano protetti dalla comparsa della forma clinica, con benefici osservabili anche nel post svezzamento. Partendo da questi presupposti la vaccinazione di scrofe e scrofette può essere utilizzata come strategia per la riduzione delle problematiche legate alla malattia di Glässer (Aragon et al., 2012).

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary microbiology* 101:143-146.
- Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R., 2004. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103: 255-258.
- Aragon V., Segales J., Oliveira S., 2012. Glässer's Disease. In: Zimmanman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. *Disease of Swine*, Blackwell Publishing, Ames (Iowa, USA) pp. 760-769.
- De la Fuente A.J.M., Tucker A.W., Navas J., Blanco M., Morrissi S.J., Gutierrez –Martin C.B., 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* 120: 1834.-191.
- Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Iodice G., Gherpelli Y., Merialdi G., Maioli G., Martelli P., 2013. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 140-142.
- Zhou X., Xu X., Zhao Y., Chen P., Zhang X., Vhen. H., Cai X., 2010. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 141: 168-73.