

DIAGNOSI DIRETTA MEDIANTE ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI *MYCOPLASMA* SPP. NEL SETTORE SUINICOLO, UN'ULTERIORE POSSIBILITÀ DIAGNOSTICA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA spp IN PIS: AN ADDITIONAL DIAGNOSTIC TOOL

CATANIA S. ¹, RUBEN S. ROSALES ², USTULIN M. ¹, FINCATO A. ¹, GOBBO F. ¹⁻³, VIO D. ¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10 Legnaro (PD);

²Animal Health and Veterinary Laboratories Agency – Weybridge, Woodham Lane, Addlestone. Surrey KT15 3NB. United Kingdom;

³Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia

Parole Chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, Isolamento

Key Words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, Isolation

Riassunto

Le micoplasmosi rappresentano una importante causa di perdita economica nel settore suinicolo industriale. Attualmente le metodiche diagnostiche maggiormente utilizzate a fini diagnostici risultano essere metodiche di biologia molecolare, capaci di dimostrare esigue quantità di DNA target. L'utilizzo di tecniche altamente sensibili può rappresentare per le attività diagnostiche un potenziale *vulnus*. Su tali basi abbiamo deciso di valutare alcuni casi necroscopici attraverso l'utilizzo di metodiche microbiologiche per valutare la presenza delle differenti specie di micoplasmi e valutare quindi questo metodo come possibile approccio diagnostico alle micoplasmosi. I nostri risultati mostrano una elevata presenza di *M. hyorhinis* nelle porzioni profonde dell'albero respiratorio, mentre per quando *M. hyopneumoniae* solamente in alcuni casi sono state evidenziate positività all'isolamento, infine solamente in un caso è stata rilevata una coinfezione.

In conclusione l'isolamento colturale pur essendo considerato un ottimo metodo diagnostico presenta alcune criticità come i tempi di risposta, i costi, e le difficoltà colturali intrinseche alle specie batteriche ricercate, inoltre necessita di campioni specifici quali i fluidi derivanti dal lavaggio broncoalveolare o porzioni polmonari. Tuttavia l'utilizzo di tale metodica dovrebbe essere contemplata tra le possibilità diagnostiche in campo suino dato che presenta specifiche peculiarità che potrebbero essere sfruttate per meglio capire il ruolo di tali microrganismi nel settore suino.

Summary

Porcine mycoplasmosis are one of the major sources of economic losses for pig producers worldwide.

The diagnostic techniques available up to date are mainly represented by molecular tests that allow us to detect reliably very low quantities of target DNA. However, for diagnostic purposes the utilization of very sensitive tests has its own drawbacks. With that in mind, we decided to study various post-mortem cases in combination with routine mycoplasma isolation in order to evaluate the strengths and weaknesses of molecular methods as part of our diagnostic approach. Our results showed a high presence of *Mycoplasma hyorhinis* in the deeper part of respiratory system in the 24 cases studied, moreover the *M.*

hyopneumoniae was easily detected by PCR methods and in some cases by isolation, and finally only in one case we found a mycoplasma co-infection.

In conclusion the gold standard method used for diagnosis, culture, is difficult and expensive, and more importantly, it requires the use of lung specimens or BAL fluid. Most diagnostic laboratories do not offer this service due to the fastidious growth of mycoplasmas, the time involved (weeks) and the potential for overgrowth by other bacteria. However in many cases the use of culture-based techniques should still be considered as part of routine laboratory investigations for porcine samples because it has specific and important strengths that could be exploited to better understand this complex area.

INTRODUZIONE

Le micoplasmosi rappresentano una delle principali cause di perdita economica nel settore suinicolo industriale. In particolare *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyosynoviae* sono considerati patogeni primari del suino; le infezioni causate da queste due specie di micoplasmi manifestano lesioni anatomopatologiche macroscopiche caratteristiche soprattutto nelle forme croniche. Altre specie di micoplasmi possono infettare il suino, quali per esempio il *M. hyorhinis*, va tuttavia evidenziato che il loro ruolo patogeno non è ancora stato definito chiaramente.

Mycoplasma hyorhinis risulta essere comunemente riscontrato a livello del tratto respiratorio superficiale; recentemente tale microrganismo è stato oggetto di studi che ipotizzano un suo potenziale coinvolgimento nello sviluppo della sindrome respiratoria del suino e in forme di polisierosite in giovani soggetti (Lin et al., 2006; Thacker and Minion, 2012). Sulla base di tali evidenze, risulta interessante capire la diffusione *Mycoplasma hyorhinis* anche nei settori profondi del tratto respiratorio attraverso metodiche microbiologiche colturali finalizzate all'isolamento di questo agente. Ad oggi, nella maggior parte dei laboratori, la diagnosi diretta delle infezioni causate da *Mycoplasma hyopneumoniae* e di *Mycoplasma hyorhinis* è basata su tecniche di biologia molecolare (*in primis* PCR). L'esame colturale con successiva identificazione di specie costituisce un'ulteriore valido strumento diagnostico di tipo diretto nei confronti dei micoplasmi, tale test permette di conservare il ceppo batterico coinvolto ed inoltre, possedendo una sensibilità minore rispetto ai comuni metodi di tipo biomolecolare, rappresenta un ottimo strumento utilizzabile a fini diagnostici.

L'esame microbiologico colturale per la ricerca di micoplasmi risulta dispendioso sia in termini di tempo (per alcune specie sono necessari tempi di incubazione fino a 4-8 settimane) che in termini di risorse umane, d'altro canto tale test presenta indubbiamente numerosi vantaggi rispetto le comuni metodiche biomolecolari. Il presente contributo vuole evidenziare le caratteristiche di tale metodo diagnostico con i suoi vantaggi ed i suoi limiti, attraverso l'utilizzo di alcuni campioni diagnostici conferiti presso i nostri laboratori.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti alla ricerca di micoplasmi con metodica colturale microbiologica e con nested PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia et al, 1999) polmoni derivanti da 25 gruppi di suini conferiti per problemi respiratori, e collezionati durante il periodo dicembre 2013 - agosto 2014 presso le Sezioni dell'IZSVe. In particolare, sono stati oggetto di studio i polmoni di suini che, al tavolo autoptico, presentavano lesioni anatomopatologiche sia ascrivibili che non ascrivibili a forme di micoplasmosi classica; oltre ai polmoni sono stati esaminati anche gli organi sede di lesione anatomopatologica di

soggetti che mostravano forme di interessamento delle sierose, in particolare pericarditi, pleuriti ed artriti.

Il prelievo dei campioni da sottoporre alle analisi microbiologiche e biomolecolari sopra menzionate è stato effettuato durante l'esame autoptico; in caso di lesioni polmonari si è proceduto al prelievo mediante tampone del contenuto di un bronchiolo in prossimità delle aree polmonari lesionate. In caso di lesioni articolari il campionamento è stato effettuato direttamente mediante tampone nella sede articolare colpita. Al fine di mantenere la vitalità delle specie di micoplasmi isolabili dal suino e di contenere le contaminazioni dovute ad altri generi batterici a crescita rapida, i campioni che non potevano essere prontamente sottoposti ad analisi, in quanto prelevati in allevamento o conferiti dalle sezioni territoriali, sono stati introdotti in idoneo mezzo di trasporto *homemade* subito dopo il prelievo ed in seguito inviati al laboratorio a temperatura di congelamento o in alternativa a temperatura di refrigerazione solo nel caso in cui potevano essere seminati entro 24 ore.

La procedura di isolamento prevede la semina in due differenti *media* liquidi e successiva incubazione dei brodi inoculati in atmosfera di CO₂ al 5% per almeno 15 giorni. I brodi vengono valutati giornalmente al fine di evidenziare eventuale viraggio o intorbidimento, in tal caso o in alternativa allo scadere dei 15 giorni, questi vengono inoculati nel medesimo terreno agarizzato e incubati alle medesime condizioni. In caso di assenza di attività metabolica si procede ad un reinocolo del brodo di prima semina (secondo passaggio).

Le piastre di terreno agarizzato seminate vengono valutate giornalmente per evidenziare la presenza di eventuali colonie tipiche per almeno 15 giorni, trascorsi i quali sono state considerate negative. In caso di evidenza di crescita si procede alla identificazione di specie mediante metodica DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) (McAuliffe et al., 2003; 2005)

RISULTATI

Sono stati analizzati 25 casi necroscopici considerati sospetti provenienti da 25 allevamenti in cui oltre all'esame colturale per micoplasmi è stata effettuata anche la PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*. Nei gruppi campionati sono inoltre rientrati due casi autoptici di suinetti da 15 giorni provenienti da due diversi allevamenti in cui è stato possibile rilevare lesioni polmonari ed interessamento pericardico.

Dei 25 casi considerati sospetti 24 mostravano lesioni anatomopatologiche a carico del parenchima polmonare, in 7 dei 24 casi sono state rilevate anche forme di pericardite e pleurite. In un solo caso è stato riscontrato un quadro di artrite fibrinosa a livello delle articolazioni del carpo e del tarso, inoltre nel medesimo soggetto è stata rilevata anche una lieve peritonite fibrinosa ed una pericardite fibrinosa di aspetto cronico.

La nested PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* è risultata positiva in 11 casi analizzati, mentre nei rimanenti 13 casi è risultata negativa; nel gruppo con evidenti lesioni articolari non è stata effettuata la PCR per ricerca *M. hyopneumoniae*. L'isolamento colturale è risultato positivo in 15 gruppi ed in particolare sono stati isolati *Mycoplasma hyorhinis* (12 positivi), *Mycoplasma hyopneumoniae* (3 positivi), *Mycoplasma arginini* (1 positivo), *Mycoplasma alkalescens* (1 positivo). Solamente in un caso è stata riscontrata la positività per due differenti specie di micoplasma e nello specifico si trattava di una coinfezione tra *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma arginini*. Inoltre solamente in un caso l'esame microbiologico non ha dato risultati utili in quanto contaminato da specie batteriche non appartenenti al genere *Mycoplasma spp.*. In Tabella 1 vengono riassunti i risultati delle indagini effettuate.

Tabella 1. Schema riassuntivo dei casi oggetto dello studio. (Legenda: 1 presenza di lesioni/positivo; 0 assenza di lesione/negativo, A articolazioni; B Bronchiolo; ND, non testato; **In grassetto i dati riguardanti i due gruppi di suini di 15 giorni**)

Caso	Lesioni Polmonari	Lesioni a carico delle sierose	Sito del prelievo	PCR per <i>M. hyopneumoniae</i>	Isolamento ed identificazione di specie
1	1	0	B	1	<i>M. alkalescens</i>
2	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>
3	1	1	B	1	<i>M. hyorhinitis</i> ; <i>M. arginini</i>
4	1	0	B	1	Negativo
5	1	0	B	1	Negativo
6	1	0	B	0	Negativo
7	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
8	1	0	B	1	<i>M. hyorhinitis</i>
9	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
10	1	1	B	0	Negativo
11	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
12	1	ND	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
13	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
14	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
15	0	1	A	nd	<i>M. hyorhinitis</i>
16	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
17	1	0	B	0	Negativo
18	1	0	B	1	Negativo
19	1	0	B	0	Negativo
20	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
21	1	0	B	1	Inquinato
22	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
23	1	0	B	1	Negativo
24	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>
25	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>

CONCLUSIONI

La ricerca di micoplasmi mediante isolamento microbiologico, anche se risulta essere una metodica dispendiosa sia in termini di tempo per l'esecuzione delle analisi che di risorse umane da impiegare, permette di evidenziare tutte le specie di micoplasmi isolabili *in vitro*. Tale caratteristica risulta essere molto importante dal punto di vista diagnostico in quanto permette di mostrare la presenza di specie di micoplasmi per i quali non sono disponibili metodiche di biologia molecolare o in casi in cui il sospetto clinico-anamnestico diagnostico non sia chiaro e pertanto risulta sconsigliato l'utilizzo di una metodica ad alta sensibilità come la PCR. Un'altra importante caratteristica della ricerca di micoplasmi mediante isolamento microbiologico, non direttamente correlata con la diagnosi primaria, risiede nella possibilità di ottenere un ceppo batterico vivo da poter sottoporre ad ulteriori indagini, quali per esempio lo studio della farmaco sensibilità tramite determinazione della M.I.C. (Minimum Inhibitory Concentration), alcune tipizzazioni genetiche con tecniche biomolecolari ed infezioni sperimentali.

I risultati di questo studio evidenziano che nella maggior parte dei campioni esaminati (15/24, 62.5%), prelevati nelle porzioni profonde dell'albero respiratorio, è stato possibile isolare almeno una specie di micoplasma. Considerata la non elevata sensibilità del metodo, nettamente inferiore a quella delle metodiche biomolecolari, si può ipotizzare che tale tasso di isolamento possa essere dovuto alla presenza in elevata quantità di micoplasmi vitali nel punto di prelievo. Tale ipotesi è rafforzata dalla valutazione del numero degli isolamenti negativi per *M. hyopneumoniae* in campioni risultati positivi alla nested-PCR per tale micoplasma, in ben 5 casi la nested-PCR ha dato esito positivo mentre l'isolamento non è stato in grado di evidenziare il patogeno: tale apparente discrepanza può essere attribuita ad una scarsa quantità di micoplasmi vitali nel punto di prelievo, alla presenza di sostanze inibenti che non permettono il mantenimento della vitalità degli stessi, oppure ad una non ottimale conservazione del campione. Si segnala inoltre che solamente in un caso necroscopico l'esame colturale per micoplasmi è risultato contaminato.

È interessante sottolineare che in 11 campioni su 24 (45.8%) il *Mycoplasma hyorhinis* è stato isolato in porzioni polmonari lesionate delle quali solamente 2 sono risultate positive alla nested-PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*; questo dato necessita sicuramente di maggiori approfondimenti per chiarire il ruolo di questa specie di micoplasma nei casi di patologia respiratoria del suino. Un altro dato, a nostro parere particolarmente interessante è l'isolamento di *M. hyorhinis* da polmoni di soggetti di 15 giorni di vita appartenenti a due allevamenti distinti presentanti forma respiratoria e negatività alla PCR *M. hyopneumoniae* da polmone; tale dato ci conferma che, almeno per il *Mycoplasma hyorhinis*, la circolazione all'interno del gruppo può essere alquanto precoce e che sono necessari ulteriori studi per capire le dinamiche dell'infezione causata da *Mycoplasma hyorhinis* ed eventualmente evidenziare le potenzialità patologiche di questo agente.

L'isolamento di *Mycoplasma hyorhinis* dalle articolazioni di soggetti con polisierosite conferma le precedenti segnalazioni riguardanti tale microrganismo (Friis and Feenstra 1994; Thacker and Minion, 2012; Gomes Neto et al., 2012).

In conclusione possiamo affermare che l'isolamento microbiologico dei micoplasmi permette di aumentare il ventaglio delle conoscenze a disposizione del diagnosta, e visto che come dimostrato per il settore del pollame questi microrganismi dimostrano una elevata adattabilità ai settori zootecnici altamente industrializzati, l'utilizzo di tali metodi laboratoristici può rappresentare un valido ausilio per l'incremento delle conoscenze delle micoplasmosi nel settore suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. (1999) "Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs". *J Vet Diagn Invest.* May;11(3):246-51.

Friis, N.F., Feenstra, A.A. (1994) "Mycoplasma hyorhinis in the etiology of serositis among piglets". *Acta Vet. Scand.* 35, 93–98

Gomes Neto J.C., Gauger P.C., Strait E.L., et al. (2012) Mycoplasma-associated arthritis: Critical points for diagnosis. *J Swine Health Prod.* 20(2):82-86.

Lin J.H., Chen S.P., Yeh K.S., Weng C.N. (2006) "Mycoplasma hyorhinis in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen". *Vet Microbiol.* Jun 15;115(1-3):111-6. Epub 2006 Mar 15.

McAuliffe L., Ellis R. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. (2003) "Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting". *Journal of Clinical Microbiology.* 41, 4844-4847.

McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. (2005) "16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for the detecting and differentiating mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology*". 54,731-739.

Thacker, E.L., Minion, F.C., (2012). "Mycoplasmosis". In: *Diseases of Swine*, Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. Tenth Edition. p 779-797.