

# MYCOPLASMA HYORINIS, HAEMOPHILUS PARASUIS E CO-INFEZIONI BATTERICHE NELLE POLISIEROSITI DEL SUINO

SALOGNI C.<sup>[1]</sup>, LAZZARO M.<sup>[1]</sup>, GIOVANNINI S.<sup>[1]</sup>, GIULIANI M.<sup>[1]</sup>, GIACOMINI E.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[2]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: Mycoplasma hyorhinis, Haemophilus parasuis, polyserositis

## Riassunto

Scopo del presente lavoro è quello di valutare le associazioni tra infezioni con Haemophilus parasuis and Mycoplasma hyorhinis ed altri patogeni batterici in suini che all'esame anatomico patologico presentavano polisierosite. Sono stati individuati 74 soggetti appartenenti a tre diverse fasi di allevamento così suddivise: 49 svezzamento (76%), 17 magronaggio (16%) e 8 sottoscrofa (8%). Da ogni soggetto sono state effettuate indagini batteriologiche e PCR. E' stato riscontrato H. parasuis in 37 casi (58%), M. hyorhinis in 31 (48%), Streptococcus sp. In 20 (31%), Pasteurella multocida in 12 (19%), Escherichia coli in 9 (14%), Actinobacillus pleuropneumoniae in 8 (13%) e Actinomyces pyogenes in 2 (3%). E' stato inoltre riscontrato un elevato numero di coinfezioni. Questo è stato particolarmente evidente per M. hyorhinis (87 %) ed H. parasuis (57%). Non è stata invece osservata nessuna relazione tra microrganismo evidenziato, categoria di animali colpiti e sierosa colpita.

## Abstract

Polyserositis is identified as an inflammation fibrinous or fibrinous-purulent frequently but not exclusively related to infection by Haemophilus parasuis and Mycoplasma hyorhinis. The most affected animals, in more virulent and acute form, are typically pigs in the weaning phase and to a lesser extent the growing-finishing. The objective of this study is to determine the associations among H. parasuis, M. hyorhinis and bacterial pathogens in 74 pigs with polyserositis. 49 post-weaning pigs (76%), 17 growing-finishing (16%) and 8 piglets (8%) were included. From each one we sampled swabs and tissues for further bacteriological and PCR investigations. It has been observed H. parasuis in 37 cases (58%), M. hyorhinis in 31 (48%), Streptococcus sp. In 20 (31%), Pasteurella multocida in 12 (19%), Escherichia coli in 9 (14%), Actinobacillus pleuropneumoniae in 8 (13%) and Actinomyces pyogenes in 2 (3%). It has been observed a high number of co-infections. This was particularly evident for M. hyorhinis (87%) and H. parasuis (57%). It was however observed no relationship between pathogen, category of affected animals or affected serosa.

## INTRODUZIONE:

L'evoluzione della gestione dell'allevamento suino e l'incremento delle produzioni hanno contribuito all'aumento della Malattia di Glässer, sostenuta da Haemophilus parasuis che da commensale del tratto superiore del apparato respiratorio in opportuna condizione può causare una patologia sistemica caratterizzata da polisierosite, artrite e meningite (1). Con il termine di polisierositi vengono identificate le infiammazioni fibrinose o fibrinoso-purulente prevalentemente a carico delle sierose (pleura, pericardio e peritoneo) che possono essere associate ad artriti, meningiti e broncopolmoniti e che interessano il suino in accrescimento. Per la diagnosi differenziale devono essere prese in considerazione le infezioni da Mycoplasma hyorhinis, un patogeno in grado di causare polisierosite, artrite e polmonite clinicamente

difficilmente distinguibile dalla Malattia di Glässer (6). In letteratura è riportata l'associazione tra *H. parasuis*, *M. hyorhinis* con il virus della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) (6) ed altri parogeni batterici quali *Streptococcus* sp. (4) ed *Escherichia coli* (7). Il riscontro di polisierosite nella sua fase acuta è tipica dei suini allevati allo svezzamento ed, in minor misura, al magronaggio. Lesioni croniche come aderenze e coalescenze sono spesso riscontrabili come reperto di esame autoptico e di macellazione. In un gruppo di soggetti colpiti da polisierosite la maggiore evidenza clinica è rappresentata da un aumento della mortalità e dell'incidenza dei suini che dimagriscono, spesso con problemi respiratori, distensione addominale e tumefazioni articolari. Scopo del lavoro è valutare le associazioni tra infezioni tra *H. parasuis*, *M. hyorhinis* ed altri patogeni batterici in suini che all'esame anatomo patologico presentavano polisierosite.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Campionamento**

Nel 2014 sono stati individuati 74 soggetti che all'esame autoptico mostravano lesioni riferibili a polisierosite. I suini conferiti alla Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER) provenivano da 39 allevamenti con problemi storici di polisierosite. Per ogni soggetto sono stati valutati lo stato di nutrizione e la fase di allevamento da cui provenivano. I suini sono stati sottoposti ad esame autoptico riportando in particolare le sierose interessate (pleura, pericardio e peritoneo), l'associazione con lesioni polmonari, articolari e meningee. Sono stati selezionati suini con segni clinici tipici e che presentavano almeno due sierose interessate. Da questi stessi soggetti sono stati prelevati campioni e sottoposti ad esame batteriologico ed indagini di biologia molecolare mediante PCR.

### **Esame batteriologico**

Da ogni soggetto incluso nello studio sono stati effettuati tamponi di sierosa pleurica, pericardica, peritoneale e sinovia articolare nonché prelievi di tessuto polmonare, renale, splenico e cerebrale che sono stati poi seminati. L'esame batteriologico è stato effettuato secondo le tecniche standardizzate presso il Laboratorio. L'identificazione dei microrganismi isolati è stata effettuata seguendo le procedure microbiologiche standard (3)

### **Indagine di biologia molecolare mediante PCR**

Dai tamponi e da porzioni di sierosa, pleurica, pericardica e peritoneale sono state eseguite PCR specifiche per la ricerca di *H. parasuis* e *M. hyorhinis*. L'estrazione del DNA totale del campione è stata effettuata con l'utilizzo di un kit a colonnine di affinità per il DNA. Le singole reazioni di amplificazione (PCR di tipo end-point) prevedono l'utilizzo di due coppie di primers specifiche in grado di amplificare una regione codificante l'rRNA 16S di *H. parasuis* (5) e una tratto codificante la proteina p37 di *M. hyorhinis* (2).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

### **RISULTATI**

Nel periodo considerato sono stati arruolati nello studio 74 soggetti con polisierosite appartenenti a tre diverse fasi di allevamento così suddivise: 49 svezzamento (76%), 17 magronaggio (16%), 8 sottoscrofa (8%).

Nella Tabella 1 sono riportate le sierose interessate e le loro associazioni riscontrate durante l'esame necroscopico.

Le lesioni riscontrate in sede autoptica hanno riguardato prevalentemente la pleura (70 casi), seguita dal pericardio (40 casi), peritoneo (24 casi). Le associazioni di sierose individuate nei singoli soggetti sono: pleuriti e pericarditi (37 casi), pleuriti e peritoniti (12 casi), pericarditi e peritoniti (20 casi), pleurite, pericardite e peritonite (19 casi). In 12 casi è stata riscontrata anche una poliartrite sierofibrinosa. La polmonite era presente in 44 dei

74 soggetti esaminati.

La tabella 2 mostra i risultati dell'esame batteriologico e della PCR mettendo in evidenza le osservazioni in purezza, in associazioni tra loro e la sede dell'isolamento.

Le indagini di laboratorio hanno consentito di individuare la positività per almeno un agente eziologico in 64 casi su 74. In particolare è stato riscontrato *H. parasuis* in 37 casi (58%), *M. hyorhinis* in 31 casi (48%), *Streptococcus* sp. in 20 casi (31%), *Pasteurella multocida* in 12 casi (19%), *Escherichia coli* in 9 casi (14%), *Actinobacillus pleuropneumoniae* in 8 casi (13%) e *Actinomyces pyogenes* in 2 casi (3%).

## DISCUSSIONE

I risultati dello studio hanno permesso di individuare nella fase di svezzamento il momento più critico per la comparsa di quadri di polisierosite (66% dei riscontri). Tuttavia il problema è presente anche nella fase magronaggio e, sebbene in minor misura, anche in sala parto. È noto che le particolari situazioni di stress a cui sono sottoposti i suini proprio nella fase di svezzamento e la frequente presenza di PRRSV rappresentano fattori molto importanti che espongono i suinetti ad infezioni di patogeni fra i quali quelli responsabili di polisierosite. Nella fase di magronaggio tale evenienza è talvolta conseguenza della cronicizzazione di polisierositi del periodo dello svezzamento oppure è collegata con l'infezione *A. pleuropneumoniae* che ha coinvolto contemporaneamente pleura e pericardio. Il dato risulta invece più allarmante se si considerano i soggetti sottoscrofa. La spiegazione potrebbe essere legata a particolari fenomeni, non indagati nel presente lavoro, quali eventi stressanti ed immunodepressivi, elevata pressione ambientale o virulenza dei microrganismi coinvolti o a carenze profilattiche.

In merito all'esame autoptico una riflessione va fatta in considerazione di come difficilmente la patologia nota come polisierosite coinvolga contemporaneamente tutte le sierose. Infatti, dalle osservazioni effettuate, solo in una ridotta percentuale di casi (26%) si può parlare di polisierosite in senso stretto. Molto più frequenti sono invece gli interessamenti pleuropericardici (50%) rispetto a quelli peritoneali. Altre lesioni anatomopatologiche associate alla polisierosite sono state la polmonite presente in un numero significativo di casi (59%), mentre l'artrite è stata riscontrata meno frequentemente (18% dei casi).

Le indagini di laboratorio hanno permesso di individuare una positività nell'86% dei casi. I microrganismi più frequentemente evidenziati sono stati *H. parasuis* (58% dei casi) e *M. hyorhinis* (48% dei casi). A questo dato, concordante con quanto riportato in bibliografia, va a sommarsi, in proporzioni variabili, la presenza di altri microrganismi quali *Streptococcus* sp. (31%), *P. multocida* (19%), *E. coli* (14%), *A. pleuropneumoniae* (13%) e *A. pyogenes* (3%). In modo particolare si è osservata un elevato grado di associazione tra i diversi patogeni. Questo è particolarmente evidente con *M. hyorhinis* (87% dei casi) ed *H. parasuis* (57% dei casi). Se per *M. hyorhinis* è noto l'effetto sinergico nel determinare la comparsa della polisierosite quando in associazione con altri microrganismi quali *H. parasuis* (6), per quest'ultimo invece dovrebbe essere preso in considerazione anche la virulenza dei diversi sierotipi coinvolti (1). In merito alla localizzazione dei microrganismo isolati è da segnalare che per alcuni di essi il quadro di polisierosite si manifesti in associazione ad una setticemia. Tale evidenza riguarda soprattutto batteri come *E. coli* (100% dei casi) ed in minor misura *Streptococcus* sp. (45%). Altri microrganismi come *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* e *A. pyogenes* sono più legati a lesioni pleuropolmonari o pleuropericardiche. Non è stata osservata nessuna differenza significativa tra microrganismo evidenziato, categoria di animali colpita e sierosa/e coinvolta/e. L'ampliamento del numero di soggetti con polisierositi da arruolare nell'indagine e l'esame delle associazioni anche con patogeni virali ed in particolare con PRRSV consentirà di migliorare e completare lo studio.

LESIONE	TOTALE CASI	CASI ASS. A PLEURITI	CASI ASS. A PERICARDITI	CASI ASS. A PERITONITI
PLEURITI	70 (95%)	#	37 (50%)	12 (16%)
PERICARDITI	40 (54%)	37 (50%)	#	20 (27%)
PERITONITI	24 (32%)	12 (16%)	20 (27%)	#
POLISIEROSITI	19 (26%)	#	#	#
POLIARTRITI	13 (18%)	#	#	#
POLMONITI	44 (59%)	#	#	#

Tabella 1 - Distribuzione ed associazioni delle lesioni osservate in sede autoptica  
Table 1 – Distribution and relationships among detected gross lesions

MICROORGANISMO	TOTALE RILEVAMENTI	FORMA BATTERICA PURA	FORMA BATTERICA ASSOCIATA	LOCALIZZAZIONE PLEUROPOLMONARE	SETTICEMIA
<i>Haemophilus parasuis</i>	37 (58%)	16 (43%)	21 (57%)	#	#
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	31 (48%)	4 (13%)	27 (87%)	#	#
<i>Streptococcus sp.</i>	20 (31%)	13 (65%)	7 (35%)	11 (55%)	9 (45%)
<i>Pasteurella multocida</i>	12 (19%)	6 (50%)	6 (50%)	9 (75%)	3 (25%)
<i>Escherichia coli</i>	9 (14%)	6 (67%)	3 (33%)	0 (0%)	9 (100%)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	8 (13%)	6 (75%)	2 (25%)	8 (100%)	#
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2 (3%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)

Tabella 2 - Rilevamenti batterici, loro associazione e localizzazione  
Table 2 - Bacteria detection, relationships and localization

## BIBLIOGRAFIA:

1. Aragon V., Cerda-Cuellar M., Fraile L., Mombarg M., Nofrarias M., Olvera A., Sibila M., Solanes D. and Segales J., 2010. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. *Veterinary Microbiology*. Vol. 142 (issue 3-4); pag. 387-393.
2. Caron J., Ouardani M. and Dea S., 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (issue 4); pag. 1390-1396.
3. Carter G.R. and Cole Jr J.R. 2012 *Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology*: Academic Press.
4. Kim D., Han K., Oh Y., Kim C.H., Kang I., Lee J., Gottschalk M. and Chae C., 2010. Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. Vol. 74 (issue 4); pag. 314-316.
5. Oliveira S., Galina L. and Pijoan C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest*. Vol. 13 (issue 6); pag. 495-501.
6. Palzer A., Haedke K., Heinritzi K., Zoels S., Ladinig A. and Ritzmann M., 2015. Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. Vol. 56 (issue 3); pag. 285-287.
7. Waxler G.L. and Britt A.L., 1972. Polyserositis and arthritis due to *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*. Vol. 36 (issue 3); pag. 226-33.