

# STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS

## STUDY ON THE TRASMISSION OF MYCOPLASMA HYORHINIS

USTULIN M.<sup>1</sup>, CATANIA S.<sup>2</sup>, GOBBO F.<sup>3</sup>, FINCATO A.<sup>3</sup>, TARGHETTA C.<sup>1</sup>,  
TOSON M.<sup>4</sup>, VIO D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN) - <sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Verona, Verona - <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (PD) - <sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Epidemiologia Veterinaria, Legnaro (PD)

**Parole chiave:** *Mycoplasma hyorhinis*, suinetti

**Keywords:** *Mycoplasma hyorhinis*, piglets

### RIASSUNTO

Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione verso *M. hyorhinis*, non solo come agente eziologico di polisierosite e artrite ma anche come agente eziologico di patologia respiratoria del suino.

Poco è noto al momento sulla sua diffusione negli allevamenti in Italia. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la presenza, diffusione e trasmissione di *M. hyorhinis* nelle vie respiratorie di suinetti in quattro allevamenti da riproduzione dai primi giorni di vita fino alle prime fasi di ingrasso.

Per *M. hyorhinis* è stata evidenziata una diffusione precoce in tutti i suini nati negli allevamenti inclusi nello studio, anche a fronte di un numero modesto di scrofe positive e una permanenza elevata nell'albero respiratorio fino ai 60 giorni di età con un calo modesto del numero di animali positivi nei due mesi successivi.

### ABSTRACT

In recent years attention over *M. hyorhinis* and its role as a pathogen has grown. This bacterium is a recognized agent of polyserositis and arthritis but also seems to have a role in Porcine Respiratory Disease Complex.

At the moment, not much is known about *M. hyorhinis* diffusion in Italian farm. Aim of the present study presence, diffusion and transmission of *M. hyorhinis* in the respiratory trait in piglets from 4 reproduction farm in North-eastern Italy from birth to beginning of fattening.

The results show an early diffusion of the bacteria to upper respiratory trait, even if in most tested farm only a small number of sows resulted positive, high permanence of the *M. hyorhinis* in the respiratory trait until 60 days of age and a modest subsequent decrease of positive animals.

### INTRODUZIONE

I Micoplasmi sono piccoli batteri ubiquitari privi di parete cellulare, patogeni e commensali di numerose specie animali.

Due specie di Micoplasma, *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, sono coinvolte nell'eziologia di patologie respiratorie nel suino (Friis e Feenstra, 1994). Nello specifico *M. hyopneumoniae* è causa di polmoniti croniche, mentre *M. hyorhinis* è agente causale di polisierositi, oltre ad essere frequentemente isolato dalle lesioni polmonari di animali con patologia respiratoria in atto (Kobish et al. 1996). Nonostante la crescente attenzione verso *M. hyorhinis* e il suo ruolo come patogeno ancora poco è noto in merito ai pattern di trasmissione, diffusione e permanenza nell'albero respiratorio di questo agente.

Il presente studio ha come scopo quello di valutare la presenza e diffusione di *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae* a livello di cavità nasali di scrofe e suinetti nelle prime settimane di vita e la loro presenza e permanenza a livello d albero bronchiale negli stessi suini nel periodo di svezzamento e magronaggio in quattro allevamenti da riproduzione.

## MATERIALI E METODI

I campionamenti relativi al presente studio sono stati effettuati tra aprile 2017 e novembre 2018 presso quattro aziende da riproduzione del Friuli Venezia Giulia.

	Azienda 1	Azienda 2	Azienda 3	Azienda 4
Dimensione (numero di scrofe)	220	250	1200	450
Genetica	Danese, rimonta esterna	Danese, rimonta esterna	Suffolk, rimonta interna	Goland, rimonta esterna
PRRS	Positiva, instabile	Positiva, stabile	Positiva, stabile	Positiva, stabile
Vaccinazioni				
Scrofe	PRRS ogni 3 mesi	PRRS ogni 4 mesi	PRRS ogni 4 mesi	PRRS 60 gg dopo la fecondazione, 6 gg dopo il parto
				Clostridiosi 35 gg prima del parto
		PCV2 ogni 4 mesi		
	Rinite atrofica a fine gravidanza	Influenza ogni 4 mesi	Influenza ogni 4 mesi	Influenza ogni 4 mesi
		Rinite a 90 giorni di gravidanza	Rinite a 90 giorni di gravidanza	Rinite a 90 giorni di gravidanza
Parvovirus e Mal Rosso allo svezzamento	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto	
Suinetti	PCV2, <i>M. hyopneumoniae</i> 21 giorni	Colibacillosi 18 gg PCV2 30 gg <i>M. hyopneumoniae</i> 80 giorni	PCV2 a 35 gg <i>M. hyopneumoniae</i> 7 gg, richiamo 28 gg	PCV2 allo svezzamento <i>M. hyopneumoniae</i> 7-10 gg, richiamo 40 gg
Trattamenti				
Scrofe	Ivermectina prima dell'entrata in sala parto	Levamisole		Ferro 21 gg prima del parto
Suinetti	Alla castrazione: cefalosporina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico	Alla castrazione: amoxicillina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico
	Anticoccidico	Anticoccidico	Anticoccidico	Anticoccidico
	Ferro	Ferro	Ferro	Ferro
	Allo svezzamento: amoxicillina	Allo svezzamento: amoxicillina	Allo svezzamento: amoxicillina	
Età di svezzamento	25	26-28	21	26-28
Bande	trisettimanali	trisettimanali	settimanali	settimanali

Tab 1: caratteristiche delle aziende selezionate/selected farms features

Il protocollo di campionamento è stato impostato ipotizzando una prevalenza intra-aziendale del 70%,  $\alpha=10\%$  e accuratezza=15%.

Da ciascun allevamento sono state identificate tre scrofe al mese per tre mesi successivi, con l'attenzione di selezionare scrofe di diverso ordine di parto in modo da avere un campione rappresentativo di tutte le età; da ciascuna scrofa è stato prelevato un tampone nasale due giorni prima della data prevista del parto.

Dopo il parto, dalla nidiata di ogni scrofa selezionata, sono stati identificati mediante apposizione di marca auricolare tre suinetti che a 2, 8, 18 giorni di età sono stati sottoposti a prelievo di un tampone nasale; contestualmente al prelievo del tampone nasale dai suinetti si è proceduto alla stessa operazione a carico della madre. Le nidiatae selezionate non sono state sottoposte ad operazione di baliaggio e pareggiamento delle nidiatae.

Al trentesimo e sessantesimo giorno di età si è proceduto ad un ulteriore prelievo di tampone nasale a carico dei suinetti precedentemente identificati. A partire dei 90 e 120 giorni di età sono stati effettuati lavaggi bronco alveolari (BAL).

È stato richiesto agli allevatori di conservare i soggetti morti nel corso dello studio al fine di sottoporli ad esame necroscopico volto a determinare le cause della morte. In funzione delle lesioni riscontrate nei soggetti deceduti, sono stati eseguiti esami batteriologici e virologici per identificare gli agenti infettivi più comuni nel suino nelle fasce di età oggetto di studio.

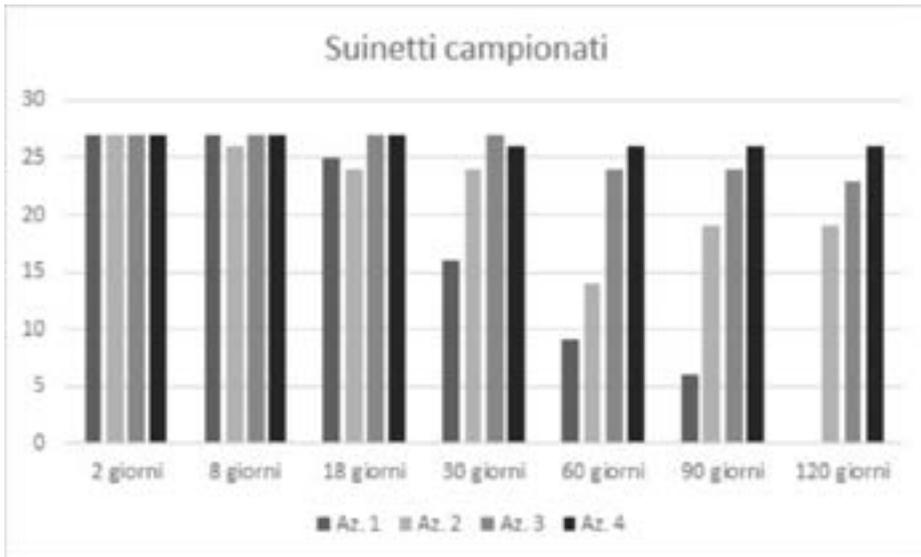
In due delle aziende selezionate sono stati in aggiunta effettuati tamponi vaginali delle scrofe selezionate per valutare ulteriori fonti di diffusione di *M. hyorhinis*.

Tamponi nasali e lavaggi bronco alveolari sono stati sottoposti alla ricerca di *M. hyorhinis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* tramite multiplex real time PCR per l'evidenziazione di un tratto specie-specifico del gene 16S di *M. hyorhinis* (Cavijo et al., 2014) e del gene p102 di *M. hyopneumoniae* (Marois et al., 2009). La metodica, sviluppata presso la Sezione Territoriale di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, prevede l'utilizzo di primer e sonda per DNA eucariotico come controllo interno (Lopez-Andreo et al., 2005).

## **RISULTATI**

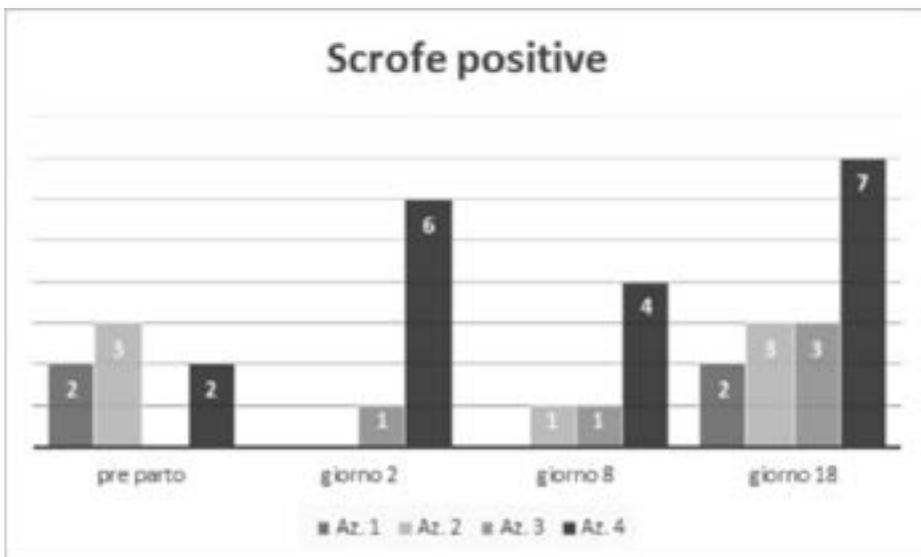
Nel corso dello studio sono stati effettuati 144 tamponi nasali da scrofe, 484 tamponi nasali da suinetti (108 a 2 giorni, 107 a 8 giorni, 103 a 18 giorni, 93 a 30 giorni, 73 a 60 giorni) e 142 BAL (75 a 90 giorni, 67 a 120 giorni).

Come si evince dalla figura 1 la diminuzione del numero di animali inclusi nella ricerca nel periodo è da imputare prevalentemente all'azienda 1, sia per una mortalità elevata nel periodo considerato che per alcune difficoltà nel tracciare gli spostamenti degli animali all'ingrasso. Inoltre, non è stato possibile effettuare uno dei campionamenti a 60 giorni nell'azienda 2.



**Fig. 1:** numero di campioni effettuati sui suinetti /numbers of sampled piglets

Dei 144 tamponi nasali effettuati da scrofe 35 sono risultati positivi. Come si evince dalla distribuzione del numero di positivi per azienda presentati in figura 2, la maggior parte di questi proveniva dall'azienda 4, nella quale 19 su 36 tamponi nasali sono risultati positivi per *M. hyorhinis*. Nell'azienda 1 sono risultati positivi 4 tamponi su 36, nell'azienda 2 sono risultati positivi 7 tamponi su 36 e 5 tamponi su 36 nell'azienda 3. Sono risultate positive a più di un tampone nasale 2 su 9 scrofe dell'azienda 2, 1 su 9 scrofe dell'azienda 3, e 6 su 9 scrofe dell'azienda 4. Nelle aziende 3 e 4 sono stati eseguiti in aggiunta tamponi vaginali nelle scrofe in analisi. Nell'azienda 3 è risultato positivo 1 tampone su 30 eseguiti, nell'azienda 4, 9 tamponi su 24.

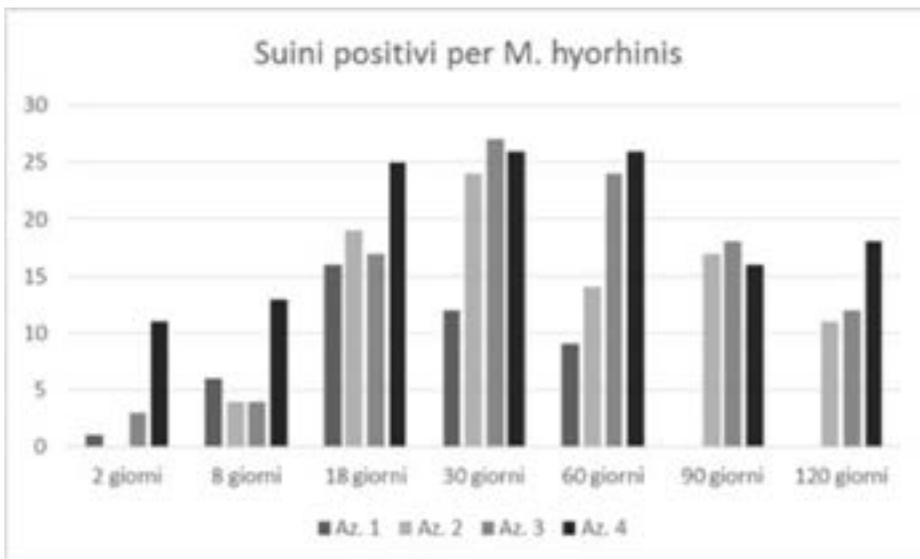


**Fig. 2:** Numero di tamponi nasali da scrofe positivi/number of positive samples for sows

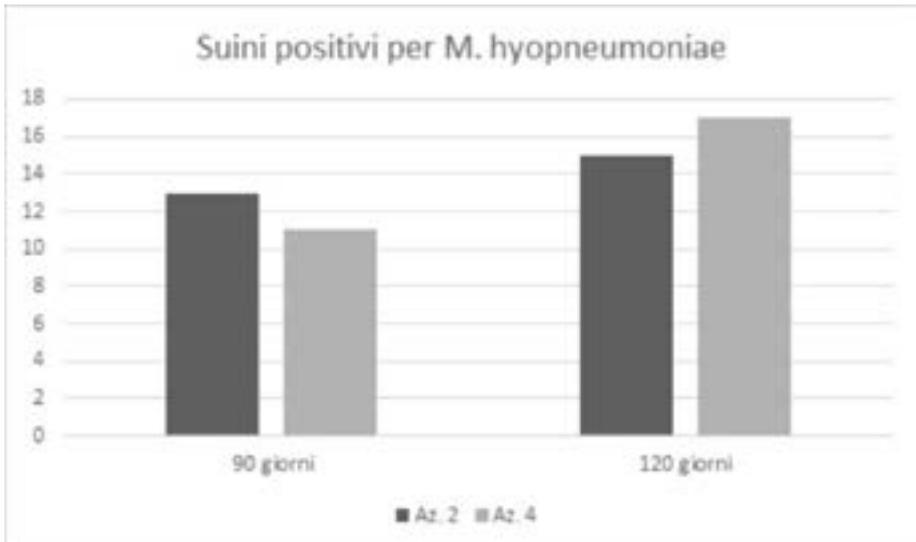
Per quanto riguarda i campioni prelevati da suinetti nel totale sono risultati positivi per *M. hyorhinis* 283/484 (58,5%) tamponi e 92/142 (64,8%) BAL. Nessun tampone nasale è risultato positivo per *M. hyopneumoniae*, mentre in due allevamenti sono stati identificati campioni di BAL positivi per *M. hyopneumoniae*, per un totale di 60 positivi sugli 89 BAL eseguiti negli allevamenti 2 e 4, di cui 46 positivi sia a *M. hyopneumoniae* che *M. hyorhinis*.

Sono stati identificati nell'azienda 1 1/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 6/27 al giorno 8, 16/25 al giorno 18, 12/16 al giorno 30, 9/9 tamponi al giorno 60, 0/6 BAL positivi al giorno 90. Nell'azienda 2 sono stati identificati 0/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 4/26 al giorno 8, 19/24 al giorno 18, 24/24 al giorno 30, 14/14 al giorno 60, al giorno 90 4/19 campioni di BAL sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, e 13/19 per *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae*, al giorno 120 1/18 campioni sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 5/18 per *M. hyopneumoniae* e 10/18 per entrambi. Nell'azienda 3 3/27 tamponi sono risultati positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 6/27 al giorno 8, 17/27 al giorno 18, 27/27 al giorno 30, 24/24 al giorno 60, 18/24 BAL al giorno 90, 12/23 al giorno 120. Nell'azienda 4 sono stati identificati 11/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 13/27 al giorno 8, 25/27 al giorno 18, 26/26 al giorno 30, 26/26 al giorno 60, al giorno 90 11/26 BAL sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 6/26 per *M. hyopneumoniae* e 5/26 per entrambi, al giorno 120 4/26 campioni sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 3/26 per *M. hyopneumoniae* e 14/26 per entrambi.

La distribuzione per allevamento e per campionamento dei positivi per *M. hyorhinis* è resa graficamente in figura 3, mentre in figura 4 sono rappresentati i positivi per *M. hyopneumoniae*.

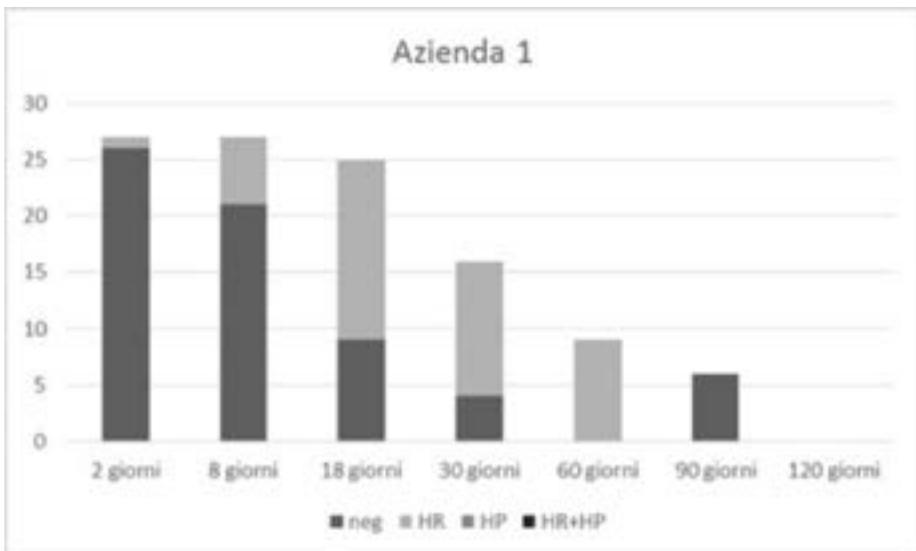


**Fig. 3:** distribuzione dei campioni positivi per *M. hyorhinis*/distribution of *M. hyorhinis* positive samples

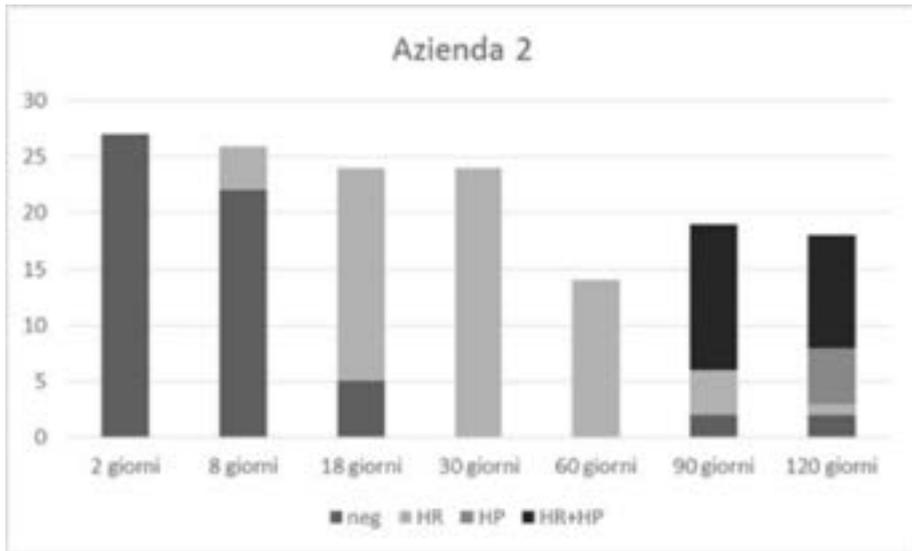


**Fig. 4:** distribuzione dei campioni positivi per *M. hyopneumoniae*/distribution of *M. hyopneumoniae* positive samples

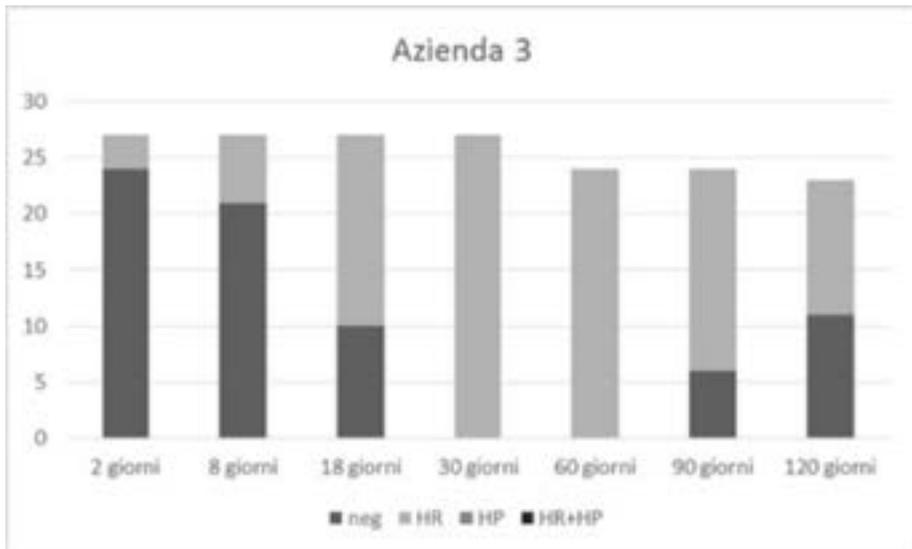
Nelle figure da 5 a 8 sono invece raccolti i risultati per singola azienda mostrando i campioni positivi per *M. hyorhinitis* (HR), per *M. hyopneumoniae* (HP), per entrambi (HR+HP) e i negativi. La figura 9 riassume invece il totale dei risultati ottenuti, ovvero per i tamponi 15/108 (13,9%) positivi *M. hyorhinitis* a 2 giorni, 29/107 (27,1%) a 8 giorni, 77/103 (74,8%) a 18 giorni, 89/93 (95,7%) a 30 giorni, 73/73 (100%) a 60 giorni, per i BAL a 90 giorni 33/75 (44%) positivi *M. hyorhinitis*, 6/75 (8%) positivi *M. hyopneumoniae*, 18/75 (24%) per entrambi e a 120 giorni 17/67 (25,4%) positivi *M. hyorhinitis*, 8/67 (11,9%) positivi *M. hyopneumoniae*, 24/67 (35,8%) per entrambi.



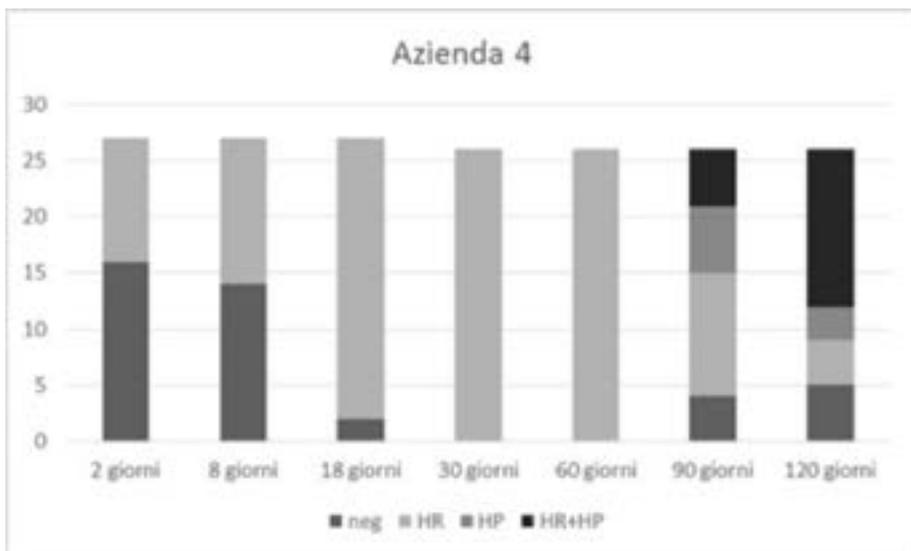
**Fig. 5:** Risultati ottenuti nell'azienda 1 per i suini/farm 1 results for pigs



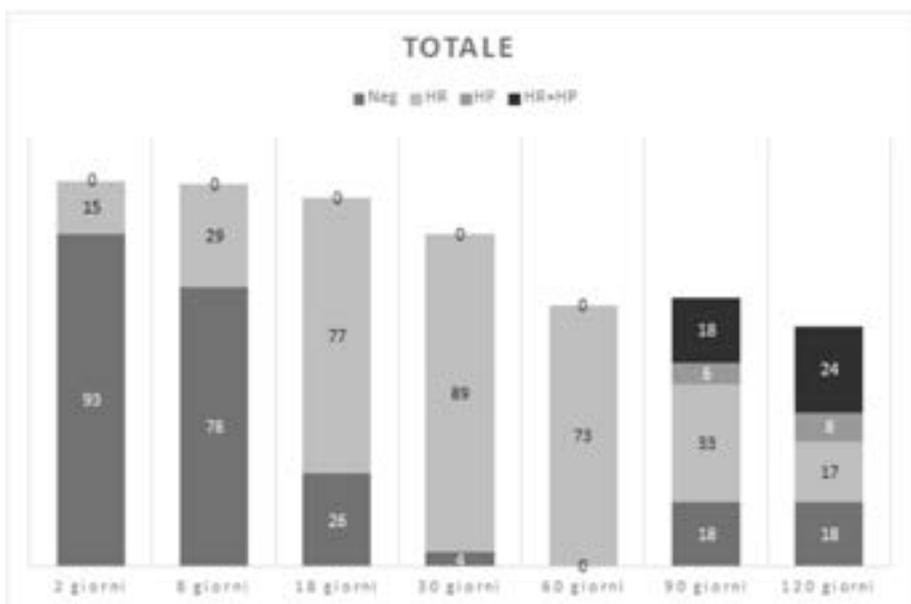
**Fig 6:** Risultati ottenuti nell'azienda 2 per i suini/ farm 2 results for pigs



**Fig. 7:** Risultati ottenuti nell'azienda 3 per i suini/ farm 3 results for pigs



**Fig. 8:** Risultati ottenuti nell'azienda 4 per i suini/ farm 4 results for pigs



**Fig 9:** Risultati totali per i suini/overall results for pigs

Nel corso dello studio sono stati segnalati i decessi di 11 suini nell'azienda 1, 6 suine nella azienda 2, 3 suinetti nell'azienda 3.

È stato possibile eseguire esami necroscopici su 5 dei 6 suini deceduti nell'azienda 2 e sui 3 suinetti deceduti nell'azienda 3. Per quanto riguarda l'azienda 2, 3 dei 5 suinetti analizzati sono deceduti per eventi traumatici, presumibilmente schiacciamento. Un soggetto deceduto a 33 giorni di età è invece deceduto in conseguente a una meningite da *Streptococcus suis*. L'ultimo soggetto analizzato, deceduto a 78 giorni di età, presentava una grave polmonite purulenta con presenza di ascessi diffusi nel tessuto polmonare, da cui è stata isolata *Trueperella pyogenes*. Il polmone è risultato positivo in PCR per PRRSV e *M. hyorhinis*.

Dei 3 suinetti relativi all'azienda 3 di cui è stata effettuata la necropsia, uno, deceduto a 42 giorni di età, presentava grave edema polmonare e deposito di fibrina a livello pleurico; la PCR per PRRSV è risultata positiva mentre le analisi per Micoplasmi negative. Un soggetto deceduto a 57 giorni di età con polmonite interstiziale e meningite fibrinosa, è risultato positivo alle PCR per PRRSV e PCV2 e negativo alla PCR per Micoplasmi. In aggiunta gli esami batteriologici hanno permesso di isolare *Streptococcus suis* dal cervello. Il terzo soggetto, deceduto a 62 giorni di età, presentava polisierosite fibrinosa, broncopolmonite purulenta con presenza di ascessi diffusi nel parenchima polmonare e iperemia dei vasi meningei. Il polmone è risultato positivo in PCR per PRRSV e negativo per Micoplasmi. Presumibilmente, a causa dello stato di conservazione, non ottimale della carcassa l'esame batteriologico non è stato conclusivo.

Nell'azienda 1 si è verificata una mortalità importante in uno dei gruppi ma, a causa di problematiche gestionali, non è stato possibile per l'allevatore conservare le carcasse, pertanto non sono stati eseguiti gli esami necroscopici previsti dal protocollo. Sono state eseguite invece analisi su soggetti coetanei deceduti che hanno evidenziato la circolazione di virus della PRRS tra i 18 e i 30 giorni di età dei suinetti; inoltre è stato isolato *Streptococcus suis* sia a livello polmonare che meningeo, non è stata evidenziata la presenza di *M. hyorhinis* o *hyopneumoniae* dal tessuto polmonare.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sui tamponi nasali prelevati da scrofe evidenziano in generale la presenza di un numero limitato di scrofe portatrici che emettono *M. hyorhinis* in maniera intermittente. Il fatto però che nell'azienda 4 si osservi la presenza di un numero nettamente maggiore di animali positivi con maggiore tendenza a mantenersi tali suggerisce che possano esistere fattori (razza, management aziendale, stato sanitario, stagionalità,...) che possano favorire il mantenimento e la diffusione del batterio. A questa evidenza si aggiunge il dato che, oltre allo scolo nasale anche altri fluidi corporei, nello specifico lo scolo vaginale, possano fungere da fonte di infezione, tanto che vi è stata rilevata la corrispondenza tra la presenza di un elevato numero di escretori a livello nasale e vaginale.

Lo studio ha evidenziato che in presenza di un numero maggiore di scrofe escrettrici si assiste ad una più rapida diffusione del patogeno tra i suinetti, ma indipendentemente da ciò, a 30 giorni di età la maggior parte dei soggetti testati è risultata positiva a livello di cavità nasali che si mantengono positive anche a due mesi di età.

A 90 giorni, fase in cui il protocollo di studio prevede la valutazione della presenza di micoplasmi a livello di basse vie respiratorie tramite il prelievo di BAL, viene confermata una elevata frequenza di campioni positivi per *M. hyorhins* a cui sia aggiungono positività per *M. hyopneumoniae*. I campioni di BAL successivi mostrano un aumento dei positivi per *M. hyopneumoniae* a fronte di un modesto calo delle positività per *M. hyorhinis*.

Le necropsie effettuate hanno permesso di evidenziare la presenza di *M. hyorhinis* a livello polmonare solo in un soggetto di 78 giorni di età con patologia polmonare avanzata.

## CONCLUSIONI

I dati raccolti evidenziano una diffusione elevata e precoce a livello intra-aziendale di *M. hyorhinis* in tutte e quattro le aziende valutate indipendentemente dal numero di scrofe rilevate come portatrici. Si identifica inoltre lo scolo vaginale come una ulteriore fonte di diffusione di questo Micoplasma, similmente a *M. bovis*, patogeno del bovino.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/15 "Ruolo di *Mycoplasma hyorhinis* nel Complesso delle Malattie Respiratorie del suino in due diversi sistemi di produzione suinicola del Nord-Est Italia" finanziata dal Ministero della Salute.

## BIBLIOGRAFIA

1. Clavijo M.J., Oliveira S., Zimmerman J., Rendahl A., Rovira A. (2014). Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhinis*. J Vet Diagn Invest. 2014 Nov;26(6):755-60. doi: 10.1177/1040638714555175. Epub 2014 Oct 15.
2. Clavijo M. J., Murray D., Oliveira S., Rovira A. (2017). Infection dynamics of *Mycoplasma hyorhinis* in three commercial pig populations. Vet Rec. 2017 Jul 15;181(3):68. doi: 10.1136/vr.104064. Epub 2017 Apr 19.
3. Friis N. F., Feenstra A.A. *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. Acta Vet Scand. 1994;35(1):93-8.
4. Kobish, M. e Friis N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. Revue scientifique et technique 15, 1569-605.
5. López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2005 Apr 1;339(1):73-82.
6. Marois C., Dory D., Fablet C., Madec F., Kobisch M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. J Appl Microbiol. 2010 May;108(5):1523-33. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04556.x. Epub 2009 Oct 7.