Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS nel 2008 si svolgono grazie al contributo di:

- **BAYER SANITÀ ANIMALE**
- **BOEHRINGER INGELHEIM**
- **CEVA VETEM**
- **CHEMIFARMA**
- **DOX-AL ITALIA**
- **ELANCO**
- **FATRO**
- **FORT DODGE ANIMAL HEALTH**
- **INTERVET ITALIA**
- **IZO**
- **JANSSEN-CILAG**
- **MERIAL ITALIA**
- **PFIZER ANIMAL HEALTH**
- **SCHERING PLOUGH**
- **TRE I**
- **VETERINARIA ESTEVE**
- **VIRBAC**

e in collaborazione con:

BCC CREDITO COOPERATIVO Mantovabanca 1896

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI - 2008

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2008

XXXIV MEETING ANNUALE

Salsomaggiore Terme (PR)

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2008

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini
XXXIV Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme (PR), 13-14 Marzo 2008.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Stamperia scrl in Parma nel mese di Marzo 2008.

ISBN 978-88-903311-0-7

INDICE

Prefazione . . . . . pag. 11

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Reggio Emilia, 20 aprile 2007

IL PUNTO SUGLI ADEMPIMENTI NORMATIVI ALL'USO DEL FARMACO NEGLI ALLEVAMENTI SUINI

Zavattini S., Cerati C. e Valtorta G.M. – La gestione del farmaco ad uso veterinario e dei mangimi medicati: aspetti pratici e problemi applicativi . . . . . .» 15

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Marmirolo (MN),12 ottobre 2007

ENDOPARASSITOSI NELLA FILIERA PRODUTTIVA DEL SUINO

Dottori M. – Le infestazioni da elminti nel suino . . . . . .» 23

Razzini P., Bignami S. – Ruolo del macello come osservatorio delle infestazioni da endoparassiti: aspetti sanitari ed economici . . . . . .» 29

Pozio E. – *Toxoplasma* e *Trichinella*: aspetti epidemiologici e riflessi zoonosici . . . . . .» 35

Licata E., Nocera L., Merialdi G. e Tamba M. – Gestione del rischio *Trichinella* e riconoscimento ufficiale di azienda esente . . . . . .» 47

ATTI DEL XXXIV MEETING ANNUALE
Salsomaggiore Terme, 13-14 marzo 2008

TAVOLA ROTONDA:
ERADICAZIONE DELLE MALATTIE

Wayne S.R. – Eliminazione della malattia respiratoria suina . . . . . .» 61

Smola J., Cizek A. – La dissenteria suina: epidemiologia, diagnosi e controllo in Repubblica Ceca . . . . . .» 67

TAVOLA ROTONDA:

LA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE IN SEGUITO ALL'EMERGENZA 2006-2007

Bellini S. – Malattia vescicolare del suino: situazione nazionale della malattia e prospettive per le nuove strategie di controllo . . . . . .» 83

Zanardi G., Alborali G.L., Bellini S., Avisani D. – La malattia vescicolare del suino in Lombardia: epidemie a confronto dal 1998 al 2007 . . . . . .» 91

Abrami S., Covi M., Cominardi P., Alborali G.L. – Gestione dei focolai: aspetti operativi e criticità . . . . . .» 103

Alborali G.L., Abrami S., Zanardi G., Avisani D., Bellini S. – Malattia vescicolare e misure di bio-sicurezza: fattori di rischio evidenziati nei focolai lombardi nel 2006-2007 . . . . . .» 115

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Barocci S., Ciuti F., Cucco L., D'Angelo G., Dettori A., Paniccià M., Sabbatini M., Magistrali C. - Indagine sulla sensibilità agli antimicrobici e rilievo dei geni codificanti per l'antibiotico-resistenza in ceppi di *Streptococcus suis* isolati in Italia . . . . . .» 127

Magistrali C., Facinelli B., Princivalli M.S., Barocci S., Cucco L., Ciuti F., Magi G., Palmieri C. - Analisi della variabilità genetica di ceppi di *Streptococcus suis* isolati da suini sintomatici ed asintomatici mediante PFGE . . . . . .» 133

Catanossi M., Crotti S., Marenzoni M.L., Maresca C., Sensi M., Tentellini M., Valente C., Magistrali C.F. - Concordanza tra diversi metodi per la diagnosi di enteriti batteriche del magronaggio e ingrasso della specie suino . . . . . .» 137

Apicella M., Giberti M., Capucchio M.T., Catalano D., Sammartano F., Valazza A., Perrone P., Guarda F.- Osservazioni al macello sulla patologia del rachide del suino pesante italiano: studio preliminare . . . . . .» 145

Baricco G., Piovano R., Malavasi C. - Manipolazione del grasso dietetico con acidi grassi a media catena: effetti sulle prestazioni dei suinetti svezzati . . . . . .» 153

Colomba D., Giraudo S., Baricco G. - Potassio diformato e sali di calcio: effetto sulle prestazioni dei suini in svezzamento . . . . . .» 157

Catalano D., Amedeo S., Bellino C., D'Angelo A., Guarda F., Perona G., Pollicino P., Savarino P., Zanatta R., Capucchio M.T. - Marcatori anatomo-patologici indotti dall'uso illegale della ractopamina nei suini: studio preliminare . . . . . .» 169

Mazzoni C., Bonilauri P., Borri E., Tonon F., Ponzio M. - Miglioramento dell'efficienza totale della sala parto in un'azienda gestita a bande bisettimanali. Esperienze di campo . . . . . .» 177

Spaggiari B., Gherpelli M., Magnino S., Fallacara F., Bonilauri P., Merialdi G. Episodio di patologia riproduttiva nel suino associato ad infezione da *Chlamidophila abortus* . . . . . .» 189

Nigrelli A.D., Alborali G.L., Boldini M., Fabbi M., Vezzoli F. - Prevalenza dell'infezione da salmonella enterica in allevamenti del Nord Italia: modello di distribuzione in fasce a differente prevalenza . . . . . .» 195

Bano L., Drigo I., Agnoletti F., Cocchi M., Ferro T., Bacchin C., Guolo A., Marcon B., Bonci M., Merialdi G. - *Clostridium difficile* nel suino: rilievi batteriologici, immunoenzimatici e biomolecolari a confronto . .» 201

Spaggiari B., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Messa a punto ed applicazioni preliminari di una metodica per la valutazione della sensibilità *in vitro* di batteri patogeni del suino nei confronti degli olii essenziali .» 209

Morandi F., Ostanello F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali G.L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Sarli G. - Indagine immunoistochimica sulla eziologia della polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) del suino in Italia: risultati preliminari . . . . . .» 215

Sensi M., Moscati L., Crotti S., Pela M., Paoloni A., Battistacci L.- Discomfort e ulcera gastrica del suino: il significato della contemporanea presenza di PRRSV e PCV2 . . . . . .» 223

Drigo M., Bortoletto G., Dematteo-Aznar M., Persona A., Martini M. - Valutazione di una strategia di acclimatamento nei confronti della PRRS su alcuni parametri riproduttivi in scrofe al primo parto . . . . . .» 231

Petrini S., Gavaudan S., Barocci S., Briscolini S., Sebastiani C. , Mancini P., Paniccià M., Villa R., Ferrari M. - Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di circovirus suino tipo 2 (PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia . . . . . .» 239

Sozzi E., Luppi A., Lelli D., Moreno A., Canelli E., Cordioli P., Lavazza A., Brocchi E.- Sviluppo e applicazione di un test ELISA per la determinazione del coronavirus della diarrea epidemica suina (PED) . . . . . .» 247

Candotti P., Dotti S., Guana S., Rota Nodari S., Amadori M., Villa R., Petrini S., Lombardi G., Ferrari M. - Sensibilita' di suini di razza Large White e Landrace sperimentalmente infettati con PRRSV . . . . . .» 253

Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Inglese N., Caprioli A., Ruggeri F.M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F. - Epidemiologia e caratterizzazione molecolare di ceppi di virus dell'epatite E (HEV) identificati in suini italiani con differenti quadri patologici . . . . . .» 257

Ferro P., Tonon F., Bonilauri P. - Valutazione dell'effetto di due diversi programmi terapeutici di medicazione nel mangime sull'*Attrition* come conseguenza della malattia respiratoria in svezzamento . . . . . .» 267

Rota Nodari S., Candotti P., Nassuato C., Ferro P., - Valutazione dell'efficacia di un programma di medicazione con tilosina e sulfametazina (T*ylan*®*Sulfa g100 premix*) nel mangime delle scrofe durante i periodi pre parto e lattazione . . . . . .» 271

Salvini F., Ferro P.- Valutazione della mortalità sottoscrofa causata da *clostridium perfringens* prima e dopo la somministrazione di tilosina tartrato (*Tylan*®solubile) ai suinetti alla nascita . . . . . .» 275

Calisesi L., Cappuccio P., Pozzi P., Fiorentini L. - Valutazione dell'efficacia di un vaccino contro *Haemophilus Parasuis* mediante indagine clinica di campo . . . . . .» 283

Rolla U., Lasagna C., Boriosi G., Martelli P., Bugliesi M., Terreni M. - Studio sul beneficio economico (ROI) della vaccinazione orale nei confronti di *Lawsonia intracellularis* in un allevamento multisede . . . . . .» 293

Terreni M., Merialdi G., Bonilauri P., Bonci M., Tittarelli C. - Studio sierologico longitudinale sulla infezione naturale da *Lawsonia intracellularis* in differenti sistemi di produzione suinicola . . . . . .» 301

Salvini F., Guadagnini G., Minelli G. - Efficacia e valutazione economica dell'impiego di *Draxxin* in corso di pleuropolmonite suina . . . . . .» 311

Zanoni M., Guadagnini G., Gradassi M., Salogni C., D'Incau M., Alborali G.L. Indagine preliminare sull'antibiotico resistenza in ceppi di *Salmonella typhimurium* isolati da suino nel periodo 2005-2007 . . . . . .» 315

Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Nigrelli A., Martelli P. - Monitoraggio della patologia respiratoria attraverso la valutazione delle lesioni polmonari, pleuriche e della sierologia . . . . . .» 319

Robino C., Menegon S., Caratti S., Gino S., Torre C., Origlia S., Viara S., Sona B. Applicazione forense di polimorfismi STR per la tracciabilità genetica di campioni biologici raccolti nel piano di sorveglianza sierologica della Malattia Vescicolare da Enterovirus del suino . . . . . .» 327

Sala V., Gusmara C., Moscati L., Brignoli P., Cabrini L. - Impiego della bioattivazione programmata per il miglioramento della qualità ambientale nell'allevamento intensivo del suino . . . . . .» 335

Giuliotti L., Orlandini G., Goracci J., Benvenuti M.N., Atticciati F. Arricchimento ambientale per suinetti in sala parto . . . . . .» 343

Tarantola M., Martano G., Zancanaro G., Fantini I., Ferenaz I. - Valutazione dell'applicazione delle misure di biosicurezza in allevamenti suini all'ingrasso e correlazione con dati produttivi . . . . . .» 351

Gaidella L., Rasori P., Cantoni C. - Il programma d'azione comunitario per la protezione ed il benessere degli animali 2006-2010 . . . . . .» 357

Calzolari M., Leotti G., Bianchi M., Sarli G., Dottori M. - Pseudo-miasi causata da *Ophyra aenescens* (diptera: muscidae) in suini da ingrasso . . . . . .» 361

Borghetti P., Ferrari L., Franceschi V., De Angelis E., Rosina S., Bottarelli E., Gozio S., Martelli P. - Immunità innata e cellulo-mediata in corso di infezione naturale da virus eterologo della PRRS: effetto della vaccinazione . . . . . .» 367

Borghetti P., Saleri R., Franceschi V., Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Rosina S., Bottarelli E., Gozio S., Martelli P. - Risposta neuroendocrina ed evoluzione clinica in corso di infezione da PRRSV: effetto protettivo della vaccinazione . . . . . .» 379

Appino S., Alborali G.L., Pregel P., Guarda F. - Mycoplasma spp. nell'artrite del suino . . . . . .» 389

Parola R., Scaglione F.E., Guarda F.- Descrizione di tre casi di teratologia nel suino . . . . . .» 393

Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Bacci B., Nigrelli A., Alborali G.L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G. - Diagnosi di PMWS in Italia: risultati di 18 mesi di attività . . . . . .» 401

Schiavon E., Vio D., Rampin F., Leotti G., Vascellari M., Mutinelli F.- Presenza di PMWS in allevamenti del Veneto e Friuli Venezia Giulia: risultati preliminari . . . . . .» 411

Castellan A., Alborali G.L., Zanoni M. - Vaccinazione intensiva nei confronti del circovirus suino tipo 2 (PCV2) nel controllo di un focolaio di malattia da pcv2 (PCVD) in un allevamento a ciclo aperto . . . . . .» 419

Pozzi P., Vezzoli F., Blanchaert A., Falco F. - Virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina e virus della malattia d'Aujeszky: vaccinazione intradermica con antigeni separati od abbinati . . . . . .» 425

Costarelli S., Belardinelli C., Noce G., Biasini G., Orsini S., Duranti A. Descrizione di un focolaio di malattia vescicolare suina nella regione Marche, nel 2007 . . . . . .» 431

Sona B., Origlia S., Viara S., Careddu M.E., Rosso F. - "Progetto Aujeszky 2007" della Regione Piemonte . . . . . .» 437

Lelli D., Moreno A., Sozzi E., Luppi A., Canelli E., Brocchi E., Cordioli P. Tipizzazione di virus influenzali suini con anticorpi monoclonali . . . .» 445

Lombardi G., Pavoni E., Faita R., Losio M.N., D'Abrosca F., Luppi A., Gelmetti D., Cordioli P., Boni P.- Infezione sperimentale in suini SPF con feci di campo contenenti il virus dell'epatite E (HEV) . . . . . .» 451

Sozzi E., Luppi A., Lelli D., Moreno A., Canelli E., Cordioli P., Brocchi E., Bugnetti M. - Identificazione molecolare di porcine teschovirus e enterovirus tramite RT-PCR . . . . . .» 459

Sandri G., Pesente P., Bittesnik S., Ferrari M., Torriani S., Giovanardi D. Eradicazione della PRRS in un grosso allevamento di scrofe mediante l'utilizzazione di "herd closure" e "wean & removal"; real time RT-PCR come metodo per rilevare bassi positivi nel sangue? . . . . . .» 467

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2008

Gradellini S., Nardelli S., Mazzoni C., Borri E., De Mateo Aznar M., Ceglie L., Granato A., Boscarato M., Schiavon E., Tonon F. - Dinamica d'infezione di *mycoplasma hyopneumoniae* e PRRS virus in un allevamento a ciclo chiuso con sistema di svezzamento a bande trisettimanali . . . . . .» 479

PREMIO MARIA, GIUSEPPE E ING. GIUSEPPE JR. ZANELLA 2008

Paoletti F., Luppi A., Bosetti M., Di Lecce R., Bonilauri P., Cordioli P. - Indagini clinico-patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) e metodi diagnostici a confronto. . . . . .» 495

PREFAZIONE

La pubblicazione del volume degli atti segna un traguardo per una Società Scientifica perché, con i testi delle relazioni tenute dagli speaker invitati e delle comunicazioni scientifiche dei Soci presentate in occasione del meeting annuale, si propone come segno tangibile dell'attività scientifica e formativa svolta nel trascorso prossimo e, per ciò, della vitalità della Società. Nel tempo in cui l'informazione diffonde in tempo reale attraverso l'intangibile web, il dubbio che il volume degli atti redatto nella sua forma cartacea tradizionale possa risultare ancora attuale sorge spontaneo per essere fugato, con altrettanta fermezza e celerità, dalla consapevolezza che il libro, con la sua fisicità, ben si presta, ancora, alla consultazione, alla rilettura, conservando quella valenza documentaristica che, da sempre, gli appartiene. Tale considerazione non deve essere letta come una ritrosia alla accettazione dell'apprezzata informatizzazione, quanto una lode al "fascino" del libro, al valore dell'opera, che coagula ricchezza di contenuti e una veste grafica curata quale è, per tradizione, quella che raccoglie gli Atti della nostra Società. Proprio da questa considerazione nasce la scelta di mantenere sostanzialmente immutata, negli anni, l'impostazione editoriale del volume. Non manca, nel contempo, la sensibilità ed il riconoscimento dell'importanza del "nuovo": dall'anno in corso i contenuti del volume saranno accessibili anche sul sito web della Società, conferendo una più ampia dimensione alla loro fruibilità, con i vantaggi che ne conseguono non solo per i Soci ma per tutti coloro che si occupano di patologia ed allevamento del suino.

Negli ultimi anni si è consolidato l'interesse per la presentazione dei contributi scientifici da parte dei Soci, a testimonianza della vivacità culturale e del fervore che anima la Società, non più solo prerogativa di coloro che si dedicano alla ricerca, ma anche di professionisti che non disdegnano il confronto e la divulgazione di quanto sperimentato e maturato attraverso la commistione di conoscenza ed esperienza. In occasione del Meeting Annuale 2008, di cui si pubblicano gli atti in questo volume, il numero dei contributi dei Soci è superiore a cinquanta. Il dato è indiscutibilmente positivo ed impone un vivo ringraziamento a tutti coloro che hanno profuso il loro impegno. E' doveroso, per contro, richiamare l'attenzione degli Autori sulla necessità che il rigore formale dei manoscritti e una certa originalità dei contenuti debbano essere mantenuti al fine di evitare che la valenza certamente positiva della numerosità si traduca in un aumento del solo spessore del volume a detrimento del valore scientifico e del reale contributo alla conoscenza. Il primato della SIPAS come società scientifica di riferimento del settore è testimoniato da evidenze che meritano di essere ricordate: il numero dei Soci è raddoppiato nell'arco di un decennio, le iniziative si sono moltiplicate, gli orizzonti culturali si sono aperti e rinnovata dinamicità è stata impressa, spronata anche dalle innumerevoli occasioni di aggiornamento professionale che in questi ultimi anni sono aumentate in modo esponenziale. La maggior parte delle Società Scientifiche "storiche" hanno attraversato momenti di ripensamento, divisioni e abbandoni. La SIPAS ha superato questa fase senza turbative, soltanto grazie alla forza e alla fiducia che ha trovato in sé stessa, innescando un ciclo virtuoso che ha portato ai risultati di cui oggi possiamo godere.

Un'ulteriore considerazione a connotazione fortemente positiva si delinea nell'individuare "nuovi volti" tra i partecipanti alle nostre iniziative. Sono sempre più numerosi i giovani, tali per anagrafe o per più recente interesse scientifico e professionale alle problematiche

del settore suinicolo, spesso guidati da colleghi più maturi o Maestri, che figurano come relatori di contributi scientifici e partecipano attivamente ai diversi momenti che vengono proposti. Se da un lato ciò testimonia il fisiologico ricambio generazionale, dall'altro è indice della continuità e della forza propulsiva che il settore può trovare nell'impegno del vigore giovanile. A questi giovani che tanto entusiasmo ripongono nell'affrontare la quotidianità, spesso non priva di difficoltà forse anche maggiori di quanto non fossero per le generazioni precedenti, dobbiamo guardare con interesse attribuendo alla loro presenza elementi rassicuranti per la continuità e la crescita della nostra società scientifica. Ciò impone un'assunzione di responsabilità verso questa generazione cui la SIPAS non si sottrarrà, dedicando loro interesse, strumenti tecnici ed una impostazione metodologica e culturale propedeutica non solo ad un inserimento professionale qualificato ma anche in grado di sostenere il futuro della Società all'altezza delle aspettative del settore.

L'occasione è opportuna per esprimere un sincero ringraziamento alle Industrie Salute Animale che, grazie alla fiducia accordata, hanno reso possibile la realizzazione più compiuta di tutte le iniziative promosse anche attraverso il sostegno finanziario, nonché a tutti coloro che, a diverso titolo, hanno collaborato a far progredire la nostra Società e a rendere possibile il conseguimento degli obiettivi statutari.

Un ringraziamento particolare ai colleghi del Consiglio Direttivo che con spirito di servizio e costante impegno sono stati artefici dei successi conseguiti e alla Segreteria Delegata per la professionalità dimostrata e per l'aperta disponibilità. A tutti i Relatori vada il plauso sincero per la competenza dimostrata. Ai lettori, con l'augurio di una proficua lettura, giunga il ringraziamento per l'attenzione che hanno dedicato alle manifestazioni della Società.

Parma, 13 marzo 2008

Il Presidente
Prof. Paolo Martelli

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO S.I.P.A.S.

IL PUNTO SUGLI ADEMPIMENTI NORMATIVI ALL'USO DEL FARMACO NEGLI ALLEVAMENTI SUINI

Reggio Emilia, 20 Aprile 2007

LA GESTIONE DEL FARMACO AD USO VETERINARIO E DEI MANGIMI MEDICATI: ASPETTI PRATICI E PROBLEMI APPLICATIVI

SIVIO ZAVATTINI[1], CARLO CERATI[1], GIOIA MARIA VALTORTA[2]
[1] Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano; [2] Regione Lombardia

L'applicazione pratica delle normative relative al farmaco veterinario e ai mangimi medicati rappresenta per il veterinario libero professionista, una costante fonte di preoccupazione dovuta, da un lato alla difficoltà obiettiva di interpretazione di norme complicate e spesso contorte e dall'altra dalla necessità di risolvere quadri clinici a rapida insorgenza e ad eziologia polifattoriale;
L'attività libero professionale del medico veterinario non può prescindere dalla conoscenza e dalla corretta applicazione delle principali norme che regolano la prescrizione e l'utilizzazione del farmaco ad uso veterinario e dei mangimi medicati.
In questa presentazione abbiamo cercato di approfondire la conoscenza delle principali norme e di chiarire i numerosi dubbi che si presentano al professionista nel momento in cui si trova a redigere una ricetta per un farmaco o per un mangime medicato.
La normativa di riferimento per i mangimi medicati è la seguente:
– Decreto Legislativo 3 marzo 1993, n. 90
– Decreto Min. Sal. 16 novembre 1993
– Decreto Min. Sal. 16 aprile 1994
– Circolare Min. Sal. 23 gennaio 1996, n. 1
– Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n. 193

Prescrizione di premiscele per alimenti medicamentosi e di mangimi medicati

L' art. 76 del D. L.vo 193/2006 vincola, di norma, la fornitura di medicinali e di premiscele medicate ad una prescrizione veterinaria, che deve essere di tipo non ripetibile in triplice copia nel caso di terapie di animali destinati alla produzione d' alimenti per l'uomo.
La ricetta non ripetibile in triplice copia ha validità di dieci giorni lavorativi dalla data di emissione.
Il modello di prescrizione da utilizzare per la prescrizione di un medicinale veterinario è indicato sul corrispondente foglietto illustrativo.
La prescrizione di un mangime medicato o di un prodotto intermedio deve essere predisposta utilizzando il modello allegato al D.Lgs. n. 90/1993, tale prescrizione ha validità di 60 giorni dalla data di compilazione; unitamente alla quantità occorre indicare anche il tipo di mangime e la diagnosi clinica sulla copia destinata al veterinario; in realtà, secondo l'interpretazione di molti, la diagnosi clinica andrebbe indicata sulla copia destinata al Servizio Veterinario (dell'A.S.L.) in modo che possa esercitare un controllo sulle prescrizioni in deroga o meno.

Premiscele per alimenti medicamentosi

Le premiscele per alimenti medicamentosi possono essere vendute direttamente solo ai titolari di impianti autorizzati alla fabbricazione di mangimi medicati e nella quantità prescritta strettamente necessaria per il trattamento o la terapia (art. 70 D. L.vo 193/2006).
Il titolare di impianti, in cui vengono curati, allevati, e custoditi professionalmente animali, può essere autorizzato dalla ASL a tenere adeguate scorte di medicinali veterinari purchè:
– sussistano valide motivazioni
– ne sia responsabile un medico veterinario che le custodisce in idonei locali chiusi e tiene apposito registro di carico e carico … (Art. 80, D. L.vo 193/2006)
E' vietato fare scorta di mangimi medicati (art. 8, D. L.vo 90/93).

Mangimi medicati

I mangimi medicati e prodotti intermedi possono contenere una sola premiscela medicata (art. 14. D. Min.Sal. 16/11/93); tuttavia, solo negli stabilimenti industriali autorizzati, in deroga a quanto previsto, è consentita, dietro prescrizione di un veterinario, la fabbricazione di mangimi medicati con più di una premiscela o di un prodotto intermedio, fino ad un limite massimo di quattro principi attivi.
Nessuna associazione è consentita in un prodotto intermedio ma in un mangime medicato si possono associare più prodotti intermedi.
L' associazione è consentita a condizione che non esista alcun agente terapeutico autorizzato specifico sottoforma di premiscela per la malattia da trattare, per la specie o la categoria animale in questione.
In tal caso, applicando quanto previsto dall'art. 3, comma 4 del D.L.vo 90/93, relativamente alla prescrizione di mangimi medicati contenenti più di una premiscela medicata autorizzata, affinché non si configuri un uso improprio di medicinali veterinari, come previsto dagli art. 10 e 11, del D.L.vo 193/2006, *le premiscele medicate associate prescritte dal medico veterinario, devono essere somministrate alla specie animale prevista dal decreto autorizzativo all'immissione in commercio delle singole premiscele, nel rispetto della posologia, delle indicazioni terapeutiche e di ogni altra indicazione prevista; nella fattispecie le premiscele medicate da utilizzare nella terapia e/o prevenzione devono contenere solo i principi attivi per i quali è consentita l'associazione nell'allegato alla circolare:*
1. sulfamidici sistemici fra loro fino ad un massimo di tre;
2. sulfamidici sistemici fra loro (massimo 3) e uno non sistemico;
3. un sulfamidico non sistemico e bacitracina;
4. uno o più sulfamidici sistemici e una ciclica;
5. uno o più sulfamidici sistemici e un macrolide;
6. sulfachinossalina e amprolium;
7. un macrolide e una cilclina;

nel caso di prescrizioni in deroga, sulla ricetta è necessario indicare che si tratta di prescrizione in deroga in base all'art. 3, comma 4 del D.L.vo 90/93; in questo caso il veterinario prescrittore ha l'obbligo di registrare il relativo trattamento sul proprio registro conforme a quanto previsto dall'art. 11, comma 4 del D.L.vo 193/06 e di prevedere non meno 28 giorni di sospensione.

Metafilassi

E' consentito che un veterinario prescriva un mangime medicato o un prodotto intermedio ad un allevatore al quale stanno per arrivare animali sotto stress o malati, per i quali è necessario un immediato trattamento preventivo o curativo: in questi casi, sulla copia della ricetta destinata all'A.S.L. dovrà essere precisato che gli animali giungeranno nell'allevamento successivamente alla data di compilazione della ricetta (circolare 23/01/96, n. 1).
Per trattamenti prolungati, specie ad indirizzo preventivo, oppure per quantitativi di mangime elevati (non devono comunque eccedere il fabbisogno mensile), la stessa ricetta può essere utilizzata, per ritirare il mangime medicato prescritto, in più riprese, non oltre il quantitativo totale indicato dal veterinario prescrittore durante il periodo di validità della stessa ricetta. Nel caso (la copia della ricetta destinata all'A.S.L. competente deve essere comunque inoltrata entro 7 giorni dall'avvenuta prima consegna) il fornitore di mangime e l'acquirente sono tenuti ad indicare, sul retro delle rispettive copie, i quantitativi di mangime medicato consegnati o ritirati ogni volta.

Medicinali veterinari

La normativa di riferimento è la seguente:
– D. L.vo 27 gennaio 1992, n. 119 (abrogato)
– D. L.vo 4 agosto 1999, n. 336 (abrogato)
– Circolare 29 settembre 2000, n. 14
– D. Min.Sal.16 maggio 2001. n. 306 (abrogato)
– D. L.vo 16 marzo 2006, n. 158
– D. L.vo 6 aprile 2006, n. 193
(N.d.A.: D. L.vo 24 luglio 2007, n.143)

Prescrizione di medicinali veterinari

L' art. 76 del decreto193/06 vieta la fornitura di medicinali senza prescrizione medico-veterinaria ed in quantità diversa da quella prescritta; inoltre i veterinari devono prescrivere la quantità minima necessaria per la terapia.
La vendita di medicinali veterinari ad azione immunologica, premiscele medicate e medicinali veterinari contenenti chemioterapici, antiparassitari, ormoni, sostanze psi-

cotrope, tranquillanti, antibiotici, corticosteroidi, antinfiammatori, sostanze neurotrope e beta agonisti, prescritti per la terapia di animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo è effettuata soltanto dietro prescrizione di ricetta medico veterinaria non ripetibile in triplice copia.
La ricetta in triplice copia ha durata di10 giorni lavorativi dalla data di emissione.
Il modello di prescrizione da utilizzare per la prescrizione di un medicinale veterinario è indicato sul corrispondente foglietto illustrativo.

Prescrizione di farmaci in deroga

L'uso in deroga di medicinali veterinari prescritti ad animali destinati alla produzione di alimenti è disciplinato dall'art. 11 del D. L.vo 193/06.
Il veterinario responsabile può, in via eccezionale, sotto la propria responsabilità ed al fine di evitare all'animale evidenti stati di sofferenza,utilizzare
a) un medicinale veterinario autorizzato in Italia per l'uso su un'altra specie animale o per un'altra affezione sulla stessa specie;
b) in mancanza di un medicinale veterinario di cui alla lettera a):
1) con un medicinale autorizzato per l'uso umano;
2) con un medicinale veterinario autorizzato in un altro Stato membro per l'uso sulla stessa specie o su un'altra specie destinata alla produzione di alimenti per l'affezione di cui trattasi o per un'altra affezione;
c) in mancanza di un medicinale di cui alla lettera b), con un medicinale veterinario preparato estemporaneamente da un farmacista a tal fine, conformemente alle indicazioni contenute in una prescrizione veterinaria.
In caso di prescrizione in deroga, il veterinario deve ricordarsi di:
– prevedere un tempo di sospensione di almeno 28 giorni per le carni suine;
– tenere un registro numerato, non vidimato, in cui annotare:
1. identificazione del proprietario e degli animali;
2. data del trattamento;
3. diagnosi;
4. medicinali prescritti;
5. dosi somministrate;
6. durata del trattamento e tempo di sospensione.
A questo proposito, da più parti ci si chiede se non sarebbe possibile sostituire tale registro con la raccolta in ordine cronologico delle ricette poiché vi sono riportate tutte le indicazione richieste ed inoltre sostituire la data d'inizio della terapia con la data della prescrizione poiché il primo è un dato che possiamo conoscere solo in un secondo tempo.

Registro dei trattamenti di animali destinati alla produzione di alimenti

L'art. 79 del D.L.vo 193/06 prevede da parte dei proprietari e i responsabili di animali destinati alla produzione di alimenti la tenuta di un registro dei trattamenti e ne detta i requisiti.

L'art. 15 del D.L.vo 158/06 richiama il registro del trattamenti, sopracitato, e individua le responsabilità in ordine alla registrazione da parte delle figure del veterinario che cura gli animale e dell'allevatore.
La circolare del Ministero della salute n. 14/2000 propone, tra gli altri, il modello di registro per la registrazione dei trattamenti
Queste tre disposizioni sono in contraddizione in alcuni punti riguardo alle registrazioni da effettuarsi a cura del veterinario o dell'allevatore; inoltre, relativamente alla necessità di registrare il numero di lotto e di riportare tale numero dal registro di scorta a quello dei trattamenti ci si chiede se non sarebbe sufficiente la registrazione riportata sulla bolla d'acquisto.
N.d A.: L'art. 79 del D.L.vo 193/06 è stato modificato dal D. L.vo 24 luglio 2007, n.143, togliendo l'obbligo di trascrivere sul registro dei trattamenti il numero di lotto dei medicinali veterinari somministrati. Il numero di lotto deve essere presente sulla bolla d'acquisto.

Dichiarazione di scorta degli animali inviati alla macellazione.

L'art. 15 del D.L.vo 158/06 al punto 6 prevede che gli animali introdotti negli stabilimenti di macellazione debbano essere scortati da una dichiarazione del titolare dell'allevamento con le seguenti indicazioni:
a) numero, specie e categoria degli animali;
b) ubicazione dell'allevamento;
c) che gli animali non sono stati trattati con sostanze di cui è vietato l'impiego;
d) eventuali trattamenti effettuati sugli animali, negli ultimi 90 giorni precedenti l'avvio alla macellazione, con le sostanze di cui agli articoli 4 e 5 (ormoni), nonché con alimenti medicamentosi o specialità medicinali; nel caso in cui siano stati effettuati tali trattamenti la dichiarazione deve essere controfirmata al momento della prescrizione o dell'invio degli animali al macello dal veterinario che ha prescritto tale trattamento.
e) che sono stati rispettati i tempi di sospensione per i trattamenti con i prodotti di cui al punto d.
In considerazione dell'elevato numero di trattamenti vaccinali effettuati fin dai primi giorni di vita e per tutte le specialità e mangimi con tempo di sospensione pari a zero giorni non si potrebbe omettere la registrazione di tali prodotti?

Sostituzione di un farmaco prescritto

L' art. 78 del D.L.vo 193/06 prevede che il farmacista responsabile della vendita può suggerire e consegnare un medicinale veterinario generico, avente denominazione diversa da quella prescritta, purché sia più conveniente da un punto di vista economico per l'acquirente; inoltre il farmacista nel caso in cui sussista l'urgenza di inizio della terapia, se il medicinale non è immediatamente disponibile, può consegnare un

medicinale analogo per composizione …… previo assenso del veterinario che ha rilasciato la prescrizione, da regolarizzare entro5 giorni per iscritto.
Giustamente il legislatore prevede che, in caso di sostituzione di un farmaco prescritto, il veterinario venga informato e ne dia l'assenso, anche ai fini della corretta registrazione sui registri di trattamenti e delle scorte, del nome corretto e del tempo di sospensione che spesse volte è molto diverso fra un'azienda farmaceutica e un'altra.
La stessa cosa non è prevista quando viene consegnato un farmaco generico all'insaputa del veterinario creando potenziali difficoltà riguardo a:
registrazione di farmaci con nome diverso;
indicazioni al proprietario o ai bioaddetti di terapie con farmaci dai nomi diversi da quelli effettivamente disponibili;
tempi di sospensione incerti con possibili errori nella compilazione della dichiarazione di scorta per l'invio di suini al macello

Scorte di farmaci
A norma del comma 2 dell'art. 81 del D.L.vo 193/06 non possono formare oggetto di scorte i medicinali veterinari contenenti antibatterici o chemioterapici da somministrarsi attraverso alimenti liquidi o solidi.
Questo comma è causa problemi applicativi molto importanti:
– difficoltà nella gestione delle terapie d'urgenza cui si in parte ovviato con l'adozione di impianti per la medicazione dell'acqua di bevanda.
– Difficoltà nel calcolo esatto della quantità di antibiotico necessario per la terapia soprattutto negli impianti con acqua di bevanda.
– Gestione continua di rimanenze di prodotto soprattutto negli allevamenti di piccole dimensioni.
– Aumento del costo delle terapie a causa del continuo approvvigionamento di piccole quantità.
– Aumento delle complicazioni nella registrazione delle ricette per scorta e per la terapia immediata.
– Notevole aumento del numero delle ricette.
N.d A.: l'articolo 81 del D.L.vo 143/07 al comma 2 prevede la possibilità di detenere quantitativi ridotti di medicinali contenenti antibatterici o chemioterapici da somministrarsi attraverso alimenti liquidi o solidi, commisurati alle necessità dell'allevamento, sufficienti per un periodo non superiore a sette giorni.

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO S.I.P.A.S.

ENDOPARASSITOSI NELLA FILIERA PRODUTTIVA DEL SUINO

Marmirolo (MN), 12 Ottobre 2007

LE INFESTAZIONI DA ELMINTI NEL SUINO

HELMINTHIASIS IN SWINE

MICHELE DOTTORI
Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

Parole chiave: Suino-Elminti-Rendimento zootecnico
Key words: Swine-Helminths-Performances

Riassunto. L'autore passa in rassegna i principali elminti del suino, con particolare riferimento a quelli significativamente presenti negli allevamenti intensivi italiani. Di essi viene sinteticamente riferito il ciclo biologico, l'interazione con l'ambiente allevamento e l'impatto sanitario e zootecnico sugli animali.

Summary. The most important helminthiasis of swine are reviewed, with focus of those who are more prevalent in Italian herds. The biological cycle, the epidemiology and the sanitary and economic impact on swine herds are considered.

A dispetto dell'indubbio miglioramento delle condizioni igieniche e sanitarie dell'allevamento intensivo del suino negli ultimi decenni, alcune elmintiasi continuano ad esistere e a costituire un problema sanitario ed economico. Sebbene non siano disponibili dati molto aggiornati sufficientemente rappresentativi della realtà italiana, nei nostri allevamenti sono ancora significativamente presenti *Ascaris suum, Trichuris suis* e, in misura minore, *Oesophagostomum spp e Hyostrongylus rubidus.* Malgrado, infatti, la relativa attenzione che si è posta e si pone a tali infestanti, i sintomi sono spesso assenti o subclinici e i danni, che riguardano la diminuzione delle prestazioni e la fertilità dei riproduttori, sono difficili da valutare e soprattutto da ascrivere alle parassitosi. L'esame coprologico, inoltre, per la determinazione e l'eventuale quantificazione degli elminti, non rientra sempre nei consueti programmi di monitoraggio. Tale metodo diagnostico può inoltre essere inficiato dalle caratteristiche intrinseche a questi parassiti, che non eliminano le uova/larve con le feci dell'ospite in maniera costante (per esempio alcune specie aumentano tale attività con la lattazione della scrofa o la diminuiscono in presenza di trattamenti). In particolare, infatti, alcune elmintiasi del suino vengono denominate silenti (*Oesophagostomum spp e Hyostrongylus rubidus).*
Una delle pratiche ormai universalmente diffuse è il trattamento delle scrofe gravide, affinché esse non fungano da serbatoi per i suinetti neonati. Le uova embrionate degli elminti sono però in genere abbastanza resistenti (meno le larve infestanti) e si diffondono facilmente anche con veicoli animati ed inanimati, attancandosi alla pelle dei suini, ai vestiti ed agli utensili. La diffusione di uova infestanti nell'ambiente degli allevamenti, spesso vanifica in parte i trattamenti farmacologici, non accompagnati da sufficienti misure igieniche, sfociando in una inevitabile reinfestazione degli animali.

I nematodi che andremo ad esaminare producono danni attraverso varie vie. Prima di tutto esplicano una azione meccanica, migrando e posizionandosi nei vari tessuti del suino, ma svolgono anche azione spogliatrice, nutrendosi delle sostanze alimentari e prodotte dall'ospite parassitato. Bisogna anche considerare che gli elminti producono metabolici tossici, che l'organismo del mammifero deve smaltire e innescano processi flogistici, che possono anche favorire i batteri di irruzione secondaria (infezione).
Di tutti i parassiti gastro-intestinali del suino, il più importante è senz'altro *Ascaris suum,* ancora molto diffuso nei nostri allevamenti, grazie alla resistenza delle sue uova embrionate nell'ambiente esterno, che dunque è responsabile di danni alla produzione zootecnica. Questo noto nematode si localizza nel piccolo intestino, è di ragguardevoli dimensioni (nelle femmine anche 40 centimetri) e per questo difficilmente sfugge anche una osservazione macroscopica del lume intestinale in sede necroscopica. Le femmine producono moltissime uova (fino ad un milione al giorno), che si appiccicano alle superfici e sono molto resistenti ai disinfettanti e alle temperature estreme (si è visto che possono rimanere infestanti anche 5-7 anni); sono però sensibili all'essicamento e alla luce solare diretta e normalmente vengono inattivate con vapore bollente e composti solforati. Le uova comunque non sono infestanti appena uscite all'esterno con le feci del suino, ma devono "maturare" per un periodo che varia dalle 2 alle 4 settimane. Il ciclo di *Ascaris suum* prevede che, una volta che le uova embrionate siano state ingerite, le larve di III stadio dall'intestino penetrino nel circolo ematico e raggiungano il fegato (dopo 1-2 giorni) e i polmoni (dopo 4-7 giorni). Sono proprio le migrazioni delle larve, specie quelle epatiche, a produrre i danni maggiori tramite l'azione meccanica e le eventuali infezioni batteriche secondarie. Le larve raggiungono poi la trachea e il faringe dal quale vengono deglutite e quindi, tornate nell'intestino tenue, maturano in vermi adulti.
La prepatenza di questo parassita è variabile (42 – 80 giorni). Difficilmente si hanno sintomi in suini con più di 4-5 mesi di età, perché si instaura una immunità, che comunque non impedisce che si instauri lo stato di portatore. Come tutti i parassiti, *Ascaris suum* ovviamente diminuisce l'incremento ponderale e peggiora l'indice di conversione alimentare. La diagnosi coprologica (ricerca delle uova nelle feci) si ritiene probante dopo le 10 settimane di vita.
Un altro nematode che nei nostri allevamenti è abbastanza frequente è *Trichuris suis.* Parassita del cieco e del colon ha discrete dimensioni (femmine di 6-8 centimetri) e, anche a causa dell'infiammazione che produce alla parete intestinale, è facilmente evidenziabile durante la necroscopia. Le caratteristiche uova (che all'esterno maturano dopo settimane o mesi) sono estremamente resistenti (anche 6-11 anni), ed è forse per questo motivo che il parassita si rinviene ancora nella moderna suinicoltura. La prepatenza è di 40-50 giorni. I "tricocefali" sono ematofagi e le loro larve si annidano nella parete intestinale, perciò possono provocare anemia, diarrea ed anche mortalità. Le feci, nei casi clinici conclamati, sono fetide, muco-sanguinolente.
Gli elminti del genere *Oesophagostomum,* che albergano nel suino, appartengono a diverse specie: le più comuni sono *O.dentatum e O.quadrispinulatum.* Nel caso di *Oesophagostomum*, sono le larve, che schiudono dalle uova emesse all'esterno con le feci, a risultare infestanti per il suino. Essendo le larve meno resistenti alle avversità

ambientali, rispetto alle uova, la possibilità di diffusione negli allevamenti intensivi igienicamente controllati è minore. Le larve di III stadio, una volta ingerite, si incistano in appositi noduli, che si localizzano alle pareti di cieco, colon e retto. La prepatenza è di 40-50 giorni. I noduli interferiscono, se numerosi, con peristalsi ed assorbimento; la clinica, quando manifesta, è più grave nei suini di poche settimane di vita. Non è dimostrata una qualche forma di immunità, anzi, le femmine del parassita regolano la produzione delle uova in modo da intensificarla nel momento in cui la scrofa parassitata sta allattando i suinetti, in modo da assicurare la trasmissione del parassita ai suinetti neonati.

Hyostrongylus rubidus è un tipico infestante dei suini allevati all'aperto, ma si può trovare anche nelle moderne porcilaie. Ancora una volta è la larva, schiusa dall'uovo eliminato nell'ambiente esterno, ad essere infestante. Una volta ingerita produce noduli all'interno delle ghiandole gastriche. Generalmente matura in verme adulto nel giro di due settimane, ma può anche rimanere latente a lungo aspettando il momento più propizio (lattazione della scrofa). Anche gli adulti vivono nello stomaco e , essendo ematofagi, possono provocare emorragie, ulcere ed anemia. La parassitosi, tuttavia, esita più frequentemente in gastrite catarrale con dimagramento e diminuzione della produzione di latte nelle scrofe. La prepatenza è di circa 30 giorni. La diagnosi coprologica non sempre è attendibile a causa della eliminazione intermittente delle uova.

Strongyloides ransomi è un piccolo nematode (4-5 millimetri), quasi invisibile durante la pratica necroscopica. Le sue larve, una volta schiuse dalle uova eliminate con le feci, sono infestanti già dopo 24 ore. Tuttavia, a seconda delle condizioni ambientali, possono optare per la maturazione all'esterno, dove divengono adulti sessualmente maturi (solo la femmina può essere anche parassita), che si accoppiano generando larve infestanti. Queste ultime infestano i suini sia venendo ingerite, che penetrando attivamente attraverso la cute. Possono anche essere trasmesse dalla scrofa ai suinetti tramite il colostro e sono stati evidenziati casi di infestazione prenatale nei feti. Le larve, infatti, oltre a compiere migrazioni attraverso il circolo ematico, il cuore e i polmoni ed essere reingerite mediante deglutizione dal faringe, possono, alternativamente, localizzarsi nel tessuto adiposo e mobilitarsi per raggiungere le mammelle alla fine della gravidanza. La prepatenza è di soli 6-10 giorni e dunque anche i suinetti sottoscrofa possono presentare le uova nelle feci, manifestando diarrea ed eventualmente mortalità.

Un altro nematode tipico dei suini allevati all'aperto è *Metastrongylus spp*. Per la sua trasmissione al suino è infatti necessario un ospite intermedio e cioè il lombrico. Le larve infatti, per divenire infestanti, devono incistarsi nell'anellide, che poi a sua volta verrà ingerito dal suino. Come è noto, *Metastrongylus spp* si localizza nei bronchi, che le larve raggiungono dall'intestino tramite il circolo ematico. Le uova del parassita sono espulse con la tosse in faringe, deglutite ed eliminate con le feci (nelle quali però il loro numero è scarso). La prepatenza è di circa 4 settimane.

Esistono anche altri elminti parassiti del suino anche se più rari. *Macracanthorhyncus hirudinaceus* è di ragguardevoli dimensioni e viene rinvenuto, seppur saltuariamente, in sede necroscopica, nei suini italiani; ha come ospiti intermedi obbligati i coleotteri coprofagi.

Nell'intestino possono essere rinvenuti anche *Globocephalus spp* e i tricostrongili dei ruminanti.
Nei polmoni sono stati rinvenuti anche esemplari del genere *Chaerostrongylus* . Nello stomaco nematodi dei generi *Ascarops, Pysocephalus e Gongylonema.* Il suino è anche ospite intermedio di alcuni cestodi, a parte il noto, ma raro, *Cysticercus cellulosae* della *Taenia solium* dell'uomo, ricordiamo il più frequente *Cysticercus tenuicollis* della *Taenia hydatigena* del cane. Vogliamo anche ricordare un parassita esotico, *Stephanurus dentatus,* molto importante in America, perché le migrazioni prodotte dalle larve nel fegato, sono sovrapponibili a quelle degli ascaridi.
Per quanto le molecole terapeutiche, disponibili nella moderna suinicoltura, siano numerose, di comprovata efficacia e somministrabili attraverso varie vie, non bisogna trascurare gli aspetti diagnostici delle parassitosi gastro-intestinali. I controlli coprologici a campione, eventualmente quantitativi, devono rientrare nell'ordinario monitoraggio e non scattare soltanto quando il rilevo necroscopico o il reperto di macellazione lo consigliano. Il controllo delle buone prassi igieniche è fondamentale per evitare la permanenza dell'infestazione e specialmente la reinfestazione a seguito di trattamenti di per sé più che efficaci. Buona prassi igienica significa non solo codificare e curare e le operazioni di disinfezione, ma soprattutto i protocolli di pulizia, e gestire in maniera sanitaria lo smaltimento dei reflui e la manutenzione delle superfici destinate al ricovero dei suini.

Bibliografia

Allen D. Leman (1992), "Swine Graphics" in "Diseases of swine"; 7th edition; Iowa State University Press / Ames, Iowa U.S.A.;

Karl-Otto Eich (1984), "Manuale di Patologia Suina"; Liviana Editrice;

Preti R., Traldi G., Da Gloria Buzinaro M., Genchi C., (1989): "Giornata di Studio su Problemi di Patologia Respiratoria del Suino da Ascaridi e Micoplasmi", Reggio nell'Emilia Sala Convegni della Rassegna Suinicola Internazionale (c/o Ente Fiera), 10 novembre 1989;

Joachim A., Dülmer N., Daugschies A, Roepstorff A., (2001): "Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany". Veterinary Parassitology 96, 135 -146;

Roepstorff A. (1991): "Transmission of intestinal helminths in Danish sow herds". Veterinary Parassitology 39, 149 – 160;

Gaasenbeek C. P. H., Borgsteede F. H. M. (1998): "Studies on the survival of *Ascaris suum* eggs under laboratory and simulated field conditions". Veterinary Parassitology 75, 227 – 234;

Boes Jaap, Nansen Peter and Stephenson Lani S. (1997): "False – positive *Ascaris suum* egg counts in pigs". International Journal for Parassitology vol. 27 n. 7, 833 – 838;

Burden D. J., Ginnivan M. J. (1978): „The destruction of pig helminth ova and larvae in a slurry treatment process". The Veterinary Record, October 21, 373 – 375;

Helwigh A. B., Nansen P. (1999): „Establishment of *Ascaris suum* in the pig: development of immunity following a single primary infection". Acta Vet. Scand. 40, 121 – 132;

Urban J. F. Jr. (1986): "The epidemiology and control of swine parasites. Immunity and vaccines". Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice vol. 2 n. 3, 765 – 778;

Orville G. Marti Jr., Otho M. Hale (1986): "Parasite transmission in confined hogs". Veterinary

Parasitology 19, 301 – 314;
Poelvoorde J. (1978): “Oesophagostomosis in Sows”. Zbl. Vet. Med. B. 25, 835 – 840;
Burden D. J., Hammet N. C., Brookes P.A. (1987): „Field observations on the longevity of *Trichuris suis* ova”. The Veterinary Record July 11, 43;
Schoneweis D. A., Rapp W. R. (1970): „*Trichuris suis* infection in young pigs„. Veterinary Medicine /Small Animal Clinician , 63 – 66;
Connan R. M. (1977): “Ascariasis: the development of eggs of *Ascaris suum* under the conditions prevailing in a pig house”. The Veterinary Record May 14, 421.

RUOLO DEL MACELLO COME OSSERVATORIO DELLE INFESTAZIONI DA ENDOPARASSITI: ASPETTI SANITARI ED ECONOMICI

PIETRO RAZZINI – SIMONA BIGNAMI
Asl della provincia di Mantova – Distretto di Viadana

Parole chiave: Endoparassiti, Suini, Macello
Key words: Internal parasites, Swine, Slaughter

Riassunto. Gli autori in base ai reperti di macellazione di oltre 600.000 suini dal settembre 2006 al agosto 2007 provenienti da 910 allevamenti ubicati nelle Regioni del Nord Italia descrivono la prevalenza delle principali endoparassitosi quali l'ascaridiosi, la cisticercosi da cisticercus teneuicollis.
Dai risultati ottenuti gli Autori concludono che il 51,26% dei suini valutati presentano ascaridiosi e
propongono uno scorring di valutazione della lesione epatica a livello ispettivo andando a valutare anche le perdite economiche dell'Industria di macellazione. Solo il 0,00033% presentano lesioni da cisticercosi.

Summary. The Authors report the prevalence of some common swine internal parassitosis namely ascaridiosis and cisticercosis (cisticercus teneuicollis). Data was obtained from more 600.000 pigs slaughtering between settember 2006 and august 2007 and farms in Northern Italy.
From result obtain, the Authors come to a conclusion that in 51,26% of the pigs were found ascaridiosis and propose on scorring to valutation of the liver lesions. They value, also, the financial loss to the slaughtering Industry. Cisticercosis was present in only 0,00033% of the pigs.

INTRODUZIONE

L'indagine è stata eseguita nell'ambito della visita ispettiva post-mortem in un macello industriale della provincia di Mantova abilitato all'esportazione di carni fresche nei Paesi Terzi, negli USA, Canada, Australia, Cina e Corea.
La finalità dell'indagine eseguita era di valutare l'incidenza delle endoparossitosi nella filiera produttiva del suino andando a determinare uno scorring standardizzato di valutazione delle lesioni epatiche. È noto che le parassitosi creano un danno economico agli allevatori per gli effetti negativi sull'organismo animale e per le difficoltà di controllo, ma il danno si ripercuote anche sulle industrie di macellazione per il deprezzamento del fegato venduto ad uso zootecnico in quanto parassitato.
L'indagine si è svolta, quindi, concentrandosi sullo scorring per le lesioni degli ascaridi rilevate durante l'ispezione post-mortem cercando di determinare anche se esiste un'incidenza stagionale e regionale.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta durante l'ispezione post-mortem di suini in un macello industriale che macella di media 13.000 suini alla settimana. I suini che si ricevono sono ibridi commerciali che hanno un peso medio di 168 Kg e tutti di età superiore ai 9 mesi.
Il periodo considerato va dal 1 settembre 2006 al 31 agosto 2007, durante il quale sono stati macellati 608.677 suini provenienti da 910 allevamenti diversi dal Nord Italia.

REGIONE	N° ALLEVAMENTI	SUINI ARRIVATI
LOMBARDIA	511	375.892
EMILIA ROMAGNA	227	123.592
VENETO	105	94.592
PIEMONTE	46	12.580
FRIULI VENEZIA GIULIA	21	2.021
	910	608.677

Le patologie riscontrate durante la visita post- mortem sono state inserite in un archivio informatico nel quale oltre alle lesioni riconducibili a parassitosi epatiche sono state registrate anche lesioni a carico del pericardio, polmone, peritoneo, intestino di natura batterica o virale.
Le lesioni apprezzabili a livello epatico della migrazione della larva A. suum, compresi i noduli del Kisselev, si manifestano in macchie superficiali bianco-latteo (WHITE o MILK SPOTS), di diametro variabile di 4-6 mm, con contorni irregolari, isolate o confluenti, con interessamento del parenchima sottostante. Il fegato si presenta aumentato di volume e in caso di un'infestazione massima disseminato delle white – spots.
Queste alterazioni sono influenzate dai meccanismi di difesa che l'organismo è in grado di apporre e dalla specificità del parassita stesso.
Lo scorring adottato in questo studio si adegua ad un'identità di macellazione elevata dove l'ispettore è impegnato in una valutazione visiva rapida che comprende l'apparato respiratorio e digerente in toto. Il metodo suggerito permette anche in queste condizioni di esprimere una valutazione numerica condivisa al fine di determinare il grado di infestazione. In base al numero delle lesioni white – spots rilevate per ogni lobo epatico si propone il seguente SCORE:

0. Nessuna lesione rilevata
1. Lesioni rilevate per lobo fino a 5 (Fig. 1)
2. Lesioni rilevate per lobo da 6 a 10 (Fig. 2)
3. Lesioni rilevate per lobo > 10. (Fig. 3)

Fig. 1. SCORE 1 –tre lesioni in un lobo

Fig. 2. SCORE 2 – sei lesioni in un lobo

Fig. 3. SCORE 3

Le lesioni epatiche causate da Cisticercus Tenuicollis determinate dalla migrazione del parassita a livello epatico si manifestano come cordoni serpiginosi rosso – scuro, successivamente intervengono fenomeni riparativi con formazione di tragitti bianco grigiastri che confluiscono ad una vescicola parassitaria in formazione.

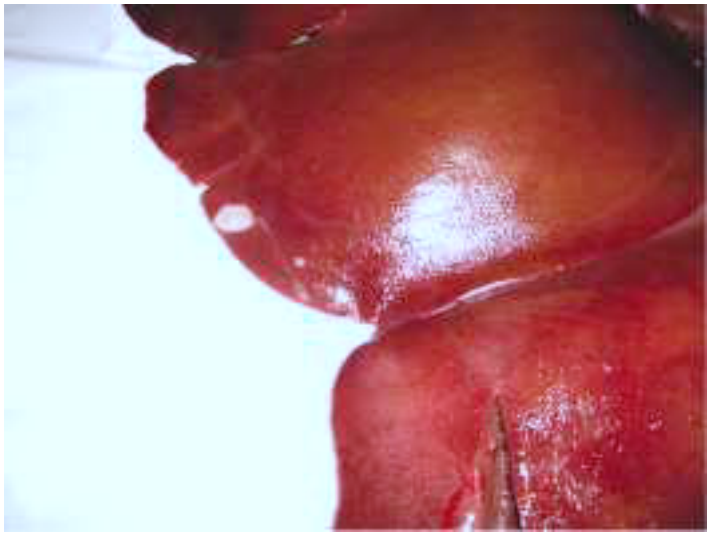


Fig. 4. Vescicola da Cisticercus Tenuicollis

RISULTATI

ASCARIDIOSI
Nel periodo in cui si è svolta l'indagine non si sono evidenziate variazioni stagionali e il grado di infestazione riferito ad allevamenti è rimasto costante.
La percentuale di positività da ascaridiosi rilevata è stata del 51,26%, nella tabella che segue è evidenziata la suddivisione geografica.

REGIONE	N° ALLEVAMENTI	SUINI ARRIVATI	% ASCARIDIOSI
LOMBARDIA	511	375.892	31,54%
EMILIA ROMAGNA	227	123.592	13,32%
VENETO	105	94.592	6,76%
PIEMONTE	46	12.580	0,04%
FRIULI VENEZIA GIULIA	21	2.021	0,00%
TOTALE	910	608.677	

CISTICERCOSI
L'incidenza di tale parassitosi si è rivelata trascurabile (0,00033%): sono state rilevate due lesioni in altrettanti fegati che hanno interessato esclusivamente la superficie del fegato senza riscontri del parassita stesso nella cavità addominale.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti permettono di giudicare il problema delle endoparassitosi nella filiera del suino ancora irrisolto. Non siamo in grado di definire se il problema è riconducibile alla mancata risposta ai trattamenti eseguiti o alle non ottimali condizioni igienico-sanitarie degli allevamenti, ma siamo in grado di fare una valutazione del mancato guadagno delle industrie di macellazione.
L'organo non edibile per parassitosi viene destinato ad uso zootecnico con un notevole deprezzamento economico rispetto all'organo destinato a libero consumo:
– Prezzo al kg del fegato uso zootecnico 0,10 €
– Prezzo al Kg. del fegato edibile 1,00 €
Nell'industria di macellazione di riferimento i fegati parassitati sono risultati 312.000 su 608.467 capi macellati con una perdita complessiva di oltre 450.000 €.
Lo score di valutazione delle lesioni epatiche da ascaridiosi può essere adottato come modello condiviso con gli addetti del settore (veterinari e allevatori) al fine di sempre meglio valutare il grado di infestazione, ma soprattutto per evidenziare eventuali miglioramenti nelle strategie profilattiche o terapeutiche adottate a livello di allevamento. Questi miglioramenti vedono nel macello un punto di osservazione privilegiato purchè gli operatori coinvolti frequentino con regolarità alle sedute di macellazione.

CONCLUSIONI

La forte incidenza delle lesioni da ascaridiosi impone all'allevatore di intervenire maggiormente con la somministrazione di antiparassitari con regolarità e in tutti i soggetti allevati. La sanificazione degli ambienti e il vuoto sanitario dell'allevamento dove possibile appare l'unica strategia capace di contenere la diffusione di tale parassitosi.
Ancora pochi allevatori dimostrano interesse alla conoscenza delle patologie evidenziate al macello dei propri suini e di conseguenza anche nella verifica dell'efficacia dei trattamenti eseguiti non solo per le malattie parassitarie.

BIBLIOGRAFIA

Griglio B.; Sattanino G.; Rosignoli M.; Guarda F.: INDAGINE SULLE ENDO-ECTO-PARASSITOSI DEL SUINO RILEVATE AL MACELLO- Large Animal Rewiew, n. 2/1996

Guarda F; Mandelli G: Trattato di anatomia Patologica – seconda edizione – Casa editrice UTET.

TOXOPLASMA E *TRICHINELLA*: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E RIFLESSI ZOONOSICI

TOXOPLASMA AND TRICHINELLA: *EPIDEMIOLOGICAL PATTERNS AND ZOONOTIC EFFECTS*

EDOARDO POZIO
Laboratorio Comunitario di Referenza per i Parassiti, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Parole chiave: *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* spp., epidemiologia, controllo, prevenzione, zoonosi
Key words: *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* spp., epidemiology, control, prevention, zoonosis

Riassunto. Il suino domestico e selvatico (*Sus scrofa*) sono il serbatoio di numerose infezioni/infestazioni parassitarie zoonotiche. Tra i principali patogeni di origine parassitaria che possono essere trasmessi all'uomo attraverso il consumo di carni crude o poco cotte, *Toxoplasma gondii* e *Trichinella* spp. rappresentano ancora un problema in Italia. Mentre per *Trichinella* vi è una legislazione europea che obbliga il controllo al momento della macellazione delle carni suine per questo patogeno, non è previsto alcun controllo per *T. gondii*. Le moderne tecniche di allevamento del suino hanno permesso l'eradicazione di *Trichinella* dagli allevamenti di tipo industriale, mentre sono ancora a rischio i suini allevati allo stato brado o in piccoli allevamenti a carattere familiare. Lo stesso non può dirsi per *T. gondii* ancora presente negli allevamenti di tipo industriale a causa della disseminazione del parassita tramite le feci dei gatti che contaminano il suolo.

Abstract. The domestic and sylvatic swine (*Sus scrofa*) are the reservoir of numerous parasitic zoonotic infections. Among the most important parasites which can reach the human beings trough the consumption of raw or semi-raw pork, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. are still a problem in Italy. While the European legislation establish the detection and control measures against *Trichinella* infestation in susceptible animals, there is no control for *T. gondii*. The modern pig farming systems have allowed the eradication of *Trichinella* infestations from industrialised pig holdings, whereas free-ranging and backyard pigs are still at risk. On the contrary, the epidemiological pattern of *T. gondii* is quite different. This pathogen is still circulating in industrialised pig holdings due to the spread of oocysts by cat faeces which contaminate the soil.

Introduzione

Numerosi parassiti zoonotici infettano/infestano l'uomo attraverso il consumo di carni di suino sia domestico che selvatico (*Sus scrofa*) (Gajadhar e coll., 2006). Probabil-

mente questa è una delle cause che ha portato alcune religioni a proibire il consumo delle carni di questo animale. Tra i protozoi, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis suihominis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium parvum* possono infettare l'uomo attraverso il consumo delle carni infette (*T. gondii* e *S. suihominis*) o per contaminazione dell'ambiente con le feci (*C. suis* e *C. parvum*). Tra gli elminti *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Trichinella britovi* e *Ascaris suum* possono infestare l'uomo per consumo di carni infestate o indirettamente attraverso un ciclo fecale-orale che nel caso di *E. granulosus* necessita del cane e nel caso di *T. solium* di individui infestati (Gamble, 1997; Genchi & Pozio, 2004).
Fortunatamente il miglioramento delle condizioni igieniche ha portato negli ultimi 40 anni ad una netta riduzione delle infezioni/infestazioni trasmesse attraverso il ciclo fecale-orale e all'eradicazione dal territorio nazionale di *T. solium*. Purtroppo a causa dell'esistenza di serbatoi naturali tra gli animali selvatici e, in parte tra quelli domestici, permangono ancora due patogeni *T. gondii* e *T. britovi*.
Scopo del presente lavoro è quello di illustrare la situazione epidemiologica di questi due parassiti zoonotici in Italia e di indicare le possibili vie per la diagnosi, controllo e prevenzione di questi patogeni per poter arrivare ad una produzione di suini esenti da parassiti zoonotici.

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii è un patogeno unicellulare (protozoo del phylum Apicomplexa) che ha come ospite definitivo i felini incluso il gatto e come ospiti intermedi tutti gli animali omeotermi (mammiferi, incluso l'uomo ed uccelli). L'ospite definitivo si infetta per ingestione di prede nei cui tessuti vi sono le cisti del parassita. L'ospite intermedio (incluso l'uomo) si infetta attraverso tre vie di trasmissione: 1) consumo di carni o altri tessuti infetti; 2) ingestione delle oocisti eliminati dai gatti con le feci e che contaminano gli alimenti, l'acqua e gli oggetti, incluso il pelo dei gatti stessi; e 3) trasmissione verticale. Inoltre l'uomo può infettarsi per trasfusione o trapianto di organi infetti (Hill e coll., 2005).
T. gondii è il parassita più diffuso tra gli animali omeotermi e l'uomo. Nel passato probabilmente è stato un 'orfano' tra i patogeni trasmessi con gli alimenti per lo scarso interesse da parte della sanità pubblica veterinaria. Negli ultimi anni, soprattutto nei paesi con una grande produzione suinicola come ad esempio, Danimarca, Germania, Olanda e Stati Uniti, c'é un crescente interesse per la produzione di suini "*Toxoplasma*-free".

Epidemiologia

I suini possono acquisire l'infezione da *T. gondii* sia tramite l'ingestione di un'unica oocisti eliminata da un gatto con le feci, sia per ingestione di tessuti di origine animale contenenti le cisti del parassita. Inoltre attraverso il passaggio dei tachizoiti dalla scrofa ai feti, se la scrofa acquisisce l'infezione durante la gravidanza. Le scrofe che hanno acquisito l'infezione sono protette nei confronti di una re-infezione per cui non vi è più un pericolo per i suinetti. La prevalenza dell'infezione da *T. gondii* nel suino è fortemente dipendente dalle modalità di allevamento e dall'età degli animali. Ad alto rischio sono i suini allevati allo stato brado e in piccoli allevamenti dove non vi è alcun controllo del mangime e della circolazione dei gatti. Studi epidemiologici effettuati sui

gatti hanno mostrato prevalenze sierologiche del 39-42% in gatti di ambienti urbani e prevalenze del 16-58% in gatti di ambienti rurali (Tabella 1 e 2). Negli allevamenti di tipo industriale dove gli animali da ingrasso non hanno mai accesso all'esterno per tutto il periodo della loro vita ed è impedito l'accesso ai gatti, la prevalenza dell'infezione scende al di sotto dell'1%. Epidemie di toxoplasmosi negli allevamenti suini possono essere causa di un'elevata mortalità nei suini giovani piuttosto che negli adulti.

Tabella 1. Sieroprevalenza delle IgG anti-*Toxoplasma gondii* nel suino domerstico.
Table 1. *Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii *IgG in domestic pigs.*

Paese	Sieroprevalenza
Argentina	38%
Brasile	0-44%
Germania	9-19%
Olanda	3-31%
Perù	28%
Portogallo	16%
Serbia	29%
Svezia	5%
USA	14-47%
Zimbabwe	20-36%

Tabella 2. Prevalenza di oocisti di *Toxoplasma gondii* nel gatto.
Table 2. *Prevalence of* Toxoplasma gondii *oocysts in the cat*

Paese	Prevalenza
Australia	1,3
Brasile	0,5
Egitto	41
Germania	1
Ungheria	1
Italia	0,4
Giappone	0,8
USA	0,7 – 1,8

Le oocisti eliminate con le feci dai gatti sono molto resistenti (Tabella 3) e sopravvivono a lungo nell'ambiente esterno soprattutto se vi è un'elevata umidità e nell'acqua. Sono state documentate numerose epidemie di toxoplasmosi causate dalla contaminazione della rete idrica con oocisti. Le cisti presenti nei tessuti degli animali infetti possono essere facilmente disattivate con il riscaldamento a 67°C per 1 minuto nel cuore del tessuto (Tabella 4 e 5) (Hill e coll., 2005).
I fattori favorenti la trasmissione di *T. gondii* al suino riguardano: 1) la possibilità di accesso all'esterno; 2) la presenza di gatti, roditori e uccelli; 3) utilizzo di alimenti non certificati; 4) stoccaggio degli alimenti in silos con possibilità di accesso per gli animali selvatici e sin antropici; 5) utilizzo di acque non controllate; 6) accesso all'allevamento di personale non autorizzato. In Italia, la possibilità di accesso per i suini da ingrasso ai palchetti esterni, possono sicuramente influire sulla trasmissione di *T. gondii*.

Tabella 3. Effetto dei disinfettanti sulle oocisti di *Toxoplasma gondii*
Table 3. *Effects of disinfectants against* Toxoplasma gondii *oocysts*

Prodotto	Concentrazione (%)	Tempo di contatto	Inattivazione
formalina	10	48 h	no
etanolo + acido acetico	95/5	1 h	no
	95/5	24 h	sì
idrossido di ammonio	5	10 min	no
	5	30 min	sì
ipoclorito di sodio	6	24 h	no
ammoniaca	5,5	1 h	no
	5,5	3 h	sì
tintura di iodio	2	10 min	no
	2	3 h	sì
	7	10 min	sì
acido paracetico	5	48 h	sì
essiccamento	19% umidità relativa	11 gg	sì
	0% umidità relativa	2 gg	no
	65% umidità relativa	7 settimane	no

Tabella 4. Influenza della temperatura sulle oocisti di *Toxoplasma gondii*
Table 4. *Temperature influence on* Toxoplasma gondii *oocysts*

Temperatura (°C)	Mezzo	Durata del trattamento	Inattivazione
In laboratorio			
-21	acqua	28 gg	no
+4	2% H_2SO_4	1,5 anni	no
+4	acqua	4,5 anni	no
+10	acqua	200 gg	no
+40	acqua	28 gg	sì
+45	acqua	3 gg	sì
+55	acqua	1 min	no
		2 min	sì
+60	acqua	1 min	sì
Sul campo			
-6,5 - +37,5	feci di gatto	410 gg	no
- 20 - +35	feci di gatto	1,5 anni	no
+15 - +30	feci di gatto	1 anno	no

Tabella 5. Sopravvivenza di larve di *Trichinella* al congelamento
Table 5. *Survival of* Trichinella *larvae to freezing*

Specie di *Trichinella*	Specie ospite	Temperatura di congelamento	Tempo di sopravvivenza
T. nativa	orso polare	-18°C	5 anni
	volpe polare	-18°C	4 anni
	orso bruno	-8 a –20°C	34 mesi
	procione	-18°C	9 mesi
	topo di laboratorio	-10°C	22 giorni
T. britovi	lupo	-20°C	6 mesi
	volpe rossa	-15°C	11 mesi
	cinghiale	-20°C	3 settimane
	topo di laboratorio	-10°C	7 giorni
T. spiralis	volpe rossa	-18°C	3 gg
	suino	-18°C	4 hs
	topo di laboratorio	-10°C	2 hs
T. nelsoni	topo di laboratorio	-10°C	no sopravvivenza

Diagnostica

Poiché i gatti rappresentano una delle principali fonti di infezione, è di primaria importanza il controllo di questi animali per *T. gondii*. La ricerca delle oocisti di *T. gondii* nelle feci dei gatti deve essere effettuata mediante un metodo di concentrazione, tuttavia la sensibilità del metodo non è elevata. Infatti oocisti di *T. gondii* sono state osservate nel 12,7% dei campioni di feci di gatto mediante osservazione microscopica e nel 87,3% mediante test in vivo (topo). Generalmente solo l'1% dei gatti elimina oocisti in un dato momento, conseguentemente l'esame sierologico da un'informazione più appropriata. Per esempio, in un allevamento di suini, le oocisti di *T. gondii* sono state osservate nell'1,8% dei campioni fecali dei gatti, nello 0,4% dei campioni di alimenti, 1,3% dei campioni di suolo, ma anticorpi anti-*T. gondii* sono stati evidenziati nel 68,3% dei gatti.

Le oocisti di *T. gondii* presenti nelle feci dei gatti o nei campioni ambientali non possono essere distinte dalle oocisti di altri coccidi (*Hammondia hammondi*, *H. heydorni*, *Neospora caninum*, *Besnoitia* spp.) mediante osservazione microscopica diretta. Ne consegue la necessità di utilizzare tecniche di amplificazione molecolare quali la PCR.

Per la diagnosi dell'infezione nel suino, si può ricorrere ad una diagnosi: 1) parassitologica tramite la ricerca delle cisti nei tessuti (muscoli, cuore, cervello, ecc.) mediante tecniche istologiche (bassa sensibilità); 2) attraverso la prova biologica nel gatto (altissima sensibilità), ma di difficile uso a causa dei problemi legati alla sperimentazione animale e all'elevatissimo costo; 3) diagnosi molecolare mediante amplificazione genica in PCR (bassa sensibilità); e 4) diagnosi sierologica mediante la ricerca degli anticorpi specifici in ELISA, utile anche per indagini epidemiologiche e con un'elevata sensibilità.

Prevenzione e controllo

Per favorire una produzione suinicola le cui carni siano esenti dalla presenza di cisti di

T. gondii, gli animali devono: 1) essere allevati in locali chiusi senza alcuna possibilità di accesso all'esterno per tutto il periodo dalla nascita alla macellazione; 2) stabilire programmi di lotta ai roditori con controlli ogni tre mesi; 3) impedire a qualsiasi animali di accedere all'allevamento (doppie porte); 4) utilizzo di mangimi certificati; 5) stoccaggio dei mangimi in silos chiusi; 6) utilizzo di acque controllate; e 7) consentire l'accesso all'allevamento esclusivamente a personale autorizzato che deve provvedere al cambio delle calzature e della tuta da lavoro all'entrata ed all'uscita dall'allevamento.
L'osservanza delle regole sopra riportate ha già mostrato i suoi benefici in alcuni allevamenti pilota degli Stati Uniti dove la prevalenza dell'infezione da *T. gondii* è stata ridotta a zero.

Trichinella spp.

I nematodi del genere *Trichinella* hanno una distribuzione cosmopolita, tuttavia non ci sono informazioni per 92 (46%) paesi a livello mondiale. Tutte le otto specie e i tre genotipi di *Trichinella* infestano i mammiferi, sette infestano i suini. Nell'uomo a livello mondiale l'incidenza annua è di 10,000 casi clinici di trichinellosi con una mortalità dello 0,2% ed una prevalenza di circa 10 milioni di infestazioni (Pozio, 2007).

Tassonomia

Il genere *Trichinella* può essere diviso in due gruppi, uno che comprende le specie che formano una capsula di collagene intorno alle larve presenti nei muscoli striati (specie incapsulate), *T. spiralis*, *T. nativa*, *Trichinella* T6, *T. britovi*, *Trichinella* T8, *T. murrelli*, *Trichinella* T9 e, *T. nelsoni*; ed un gruppo le cui larve non inducono la formazione della capsula di collagene (specie non incapsulate), *T. pseudospiralis* che infesta anche gli uccelli, e *T. papuae* e *T. zimbabwensis* che infestano anche alcuni rettili (principalmente coccodrilli e varani) (Pozio & Murrell, 2006).

Epidemiologia

Questi parassiti sono mantenuti in natura attraverso un ciclo selvatico. Il ciclo selvatico è presente in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartico dove non sono mai state effettuate ricerche. La scorretta gestione della fauna selvatica e degli animali domestici può favorire la trasmissione di *Trichinella* sp. dall'ambiente silvestre a quello domestico (o viceversa) con l'instaurazione di un ciclo domestico (Pozio & Murrell, 2006).
I principali serbatoi di questi nematodi parassiti zoonotici sono i vertebrati onnivori o carnivori (mammiferi, uccelli o rettili) con abitudini di spazzini, cannibalistiche, un ciclo di vita di alcuni anni, in cima alla catena alimentare.
Il ciclo domestico si instaura dove non vengono rispettate le corrette pratiche di allevamento e i suini sono alimentati con avanzi della macellazione e rifiuti di origine alimentare contenenti carne suina, carcasse di suini o di animali selvatici. Il ciclo domestico include anche i suini allevati nelle discariche di rifiuti alimentari, i suini alimentati con carcasse di animali oggetto di attività venatoria, e i cavalli alimentati con avanzi della macellazione di suini.
Il più comune agente eziologico del ciclo domestico è *T. spiralis* ben adattata al suino

nel quale ha un tasso riproduttivo molto elevato senza indurre la malattia clinica. Occasionalmente, *T. britovi* può essere trasmessa attraverso il ciclo domestico quando i suini sono alimentati con i resti di animali oggetto di attività venatoria o vengono fatti pascolare in discariche dove sono state abbandonate carcasse di animali selvatici. *T. britovi* è praticamente l'unica specie di *Trichinella* presente in Italia (Pozio e coll., 2001). Il serbatoio è rappresentato dai carnivori selvatici (volpe, lupo, mustelidi). Talvolta infesta i cinghiali dove la prevalenza è inferiore all'1‰. Fortunatamente questa specie non trova nei suidi domestici e selvatici un ambiente ottimale per cui il numero di larve presenti nei muscoli è generalmente molto limitato (Dupouy-Camet & Murrell, 2007).

Nell'uomo, l'infestazione da *Trichinella* è correlata alle abitudini culturali che includono cibi a base di carne cruda o poco cotta. La presenza del parassita negli animali domestici e/o selvatici non è un rischio sufficiente per il manifestarsi di infestazioni nell'uomo. Per esempio, in Finlandia dove c'è un'elevata prevalenza di infestazione sia negli animali domestici che selvatici, non è stata documentata alcuna infestazione nell'uomo perché non vi è l'abitudine a consumare carni crude. I focolai di trichinellosi umana per consumo di carne equina in Italia si sono verificati nelle regioni (Lombardia, Emilia Romagna e Puglia) dove vi è un'alta percentuale di individui che consuma carne equina cruda secondo le abitudini culinarie francesi. A livello mondiale, la principale fonte di infestazione per l'uomo è la carne suina e i prodotti derivati. Tuttavia le carni poco cotte o crude di carnivori e onnivori (mammiferi, rettili e uccelli) rappresentano un ulteriore importante rischio per la trasmissione di questi patogeni all'uomo.

Nei paesi dell'Unione Europea, Stati Uniti e Canada, le infestazioni umane causate dalla carne suina sono quasi del tutto scomparse per il miglioramento della produzione suinicola e delle tecnologie impiegate presso i macelli. In questi paesi, le infestazioni occasionali causate da *T. spiralis* sono dovute al consumo di carni provenienti da suini di piccoli allevamenti familiari o allevati allo stato brado.

Nei primi 15 paesi dell'UE, tra il 1975 e il 2006 sono stati documentati circa 8.100 casi di cui cinque mortali (0.08%). I casi di infestazione causati dal consumo di carni di produzione nazionale sono stati osservati in Francia, Germania, Italia e Spagna. Il ciclo domestico dal dopo guerra ad oggi non è mai stato documentato in Italia. Tutte le infestazioni autoctone sia umane che del suino sono riconducibili al ciclo silvestre (Tabella 6 e 7) (Dupouy-Camet & Murrell, 2007).

Tabella 6. Suini riscontrati positivi all'esame ispettivo per *Trichinella* in Italia dal 1958.
Table 6. *Pigs detected positive for* Trichinella *at the veterinary inspection in Italy, since 1958.*

Anno	Regione (località)	No. di suini	Tipologia allevamento	Fonte dell'infezione
1959	Campania (Palomonte)	1	brado	non riportata
1961	Sicilia (Montemaggiore Belsito)	1	porcilaia familiare	avanzi macellazione di una scrofa infetta
1966	Puglia (Candela)	1	brado	non riportata
1968	Puglia (Mattinata)	1	brado	non riportata
1973	Basilicata (Palazzolo S. Gervasio)	3	brado	non riportata
1985	Molise	1	porcilaia familiare	non riportata
1987	Calabria (Sila)	1	brado	non riportata
1989	Puglia (Gargano)	1	porcilaia familiare	non riportata
1992	Basilicata (Garaguso)	2	porcilaia familiare	carne di volpe
1993	Campania (Vallo di Diano)	1	brado	non riportata
2006	Sardegna (Orgosolo)	4	brado	avanzi macellazione di una scrofa infetta

Tabella 7. Fonte dell'infestazione da *Trichinella* nell'uomo, focolai, numero di persone infestate e regioni coinvolte in Italia dal 1948 al 2007.
Table 7. *Source of human trichinellosis, number of outbreaks and human cases and region of origin from 1948 to 2007.*

Fonte dell'infezione	No. di focolai	No. di casi (%)	Regione
Suino	9	157 (11)	Basilicata, Calabria, Lazio, Puglia, Sardegna, Toscana, Umbria
Suino d'importazione	2	11 (0,8)	Lazio, Lombardia
Cinghiale d'allevamento	3	111 (7,8)	Basilicata, Piemonte, Puglia
Cinghiale oggetto di attività venatoria	4	87 (6,1)	Abruzzo, Basilicata Umbria
Volpe	2	11	Trentino, Calabria
Cavallo d'importazione	7	1.038 (73,3)	Emilia Romagna, Lombaria, Puglia
Totale	27	1.415	

Le larve di alcune specie di *Trichinella* possono sopravvivere nei muscoli congelati. Il tempo di sopravvivenza è maggiore tra 0°C e -18°C. Le larve incapsulate di *Trichinella* sopravvivono a lungo anche nelle carni in putrefazione ed il tempo di sopravvivenza è favorito da un'elevata umidità e bassa temperature. Le larve sopravvivono nella capsula di collagene anche quando il tessuto muscolare è completamente liquefatto (Dupouy-Camet & Murrell, 2007).

Diagnosi nel suino

Il regolamento comunitario 2075/2005 ha definitivamente ed approfonditamente regolamentato le modalità di ricerca delle larve di *Trichinella* negli animali suscettibili (Commissione Europea, 2005; Community Reference Laboratory for Parasites, 2006;

Gamble e coll., 2000; Linee Guida del Ministero della Salute, 2007; Pozio, 2008). Le varie metodiche ammesse dal regolamento sono riconducibili a tre diverse procedure: 1) digestione artificiale di campioni aggregati fino a 100 gr; 2) Trichomatic 35 fino a 35 gr; e 3) Stomacher lab-blender 3500 fino a 100 gr (Tabella 8) (Forbes e coll., 2003; 2005).

Tabella 8. Muscoli e peso dei campioni per la ricerca di larve di *Trichinella* secondo il regolamento europeo 2075/2005.
Table 8. *Muscle and weight of samples for the detection of* Trichinella *larvae according to the European Directive 2075/2005.*

Specie	Sito di prelievo	Peso in gr per l'esame 1° istanza	Peso in gr per l'esame 2° istanza	Peso in gr per la conferma di positività
suino da ingrasso	pilastri diaframma	>1 gr	>20 gr	>20 gr
	massetere, lingua, mm addominali, diaframma prossimo alle costole o sterno	>2 gr	>20 gr	>20 gr
scrofe e verri	pilastri diaframma	>2 gr	>20 gr	>20 gr
	massetere, lingua, mm addominali, diaframma prossimo alle costole o sterno	>4 g	>20 gr	>20 gr
equini	lingua, massetere	>10 gr	>50 gr	>50 gr
cinghiali	lingua, diaframma, tibiale	>10 gr	>50 gr	>50 gr

N.B. Il peso in grammi si riferisce al solo muscolo striato
N.B. se si utilizza la lingua, necessita di asportare lo strato superficiale che non è digeribile

La digestione artificiale è uno dei pochi test diagnostici che non prevede l'utilizzo di campioni di controllo positivi e negativi, pertanto è assolutamente necessario che prima di procedere all'utilizzo della metodica nella routine del laboratorio, il saggio diagnostico sia correttamente validato (Dupouy-Camet & Murrell, 2007; Gajadhar and Forbes, 2002).
Come tutti i test diagnostici, anche questi presentano dei punti critici che possono portare ad errate diagnosi (Forbes & Gajadhar, 1999; Leclair e coll., 2003). I principali punti critici sono:
1) le larve (sia vitali che morte) aderiscono molto facilmente alle superfici dei contenitori soprattutto di plastica per cui è imperativo l'uso di materiale di vetro;
2) la pepsina deve essere conservata in ambiente fresco e secco ed il contenitore deve essere attentamente chiuso, l'attività enzimatica si riduce con il tempo (< 2 anni);
3) nella preparazione del liquido digestivo, aggiungere sempre la pepsina alla soluzione di acqua e acido cloridrico, mai all'acido cloridrico prima dell'aggiunta dell'acqua;
4) controllare attentamente la temperatura dell'acqua; infatti ad una temperatura inferiore ai 37-38°C l'attività della pepsina si riduce; ad una temperatura superiore ai 45-46°C la pepsina viene disattivata;

5) controllare attentamente le maglie del setaccio al microscopio per verificare che non vi siano residui che impediscano la filtrazione con la conseguente perdita delle larve eventualmente presenti;
6) controllare l'efficienza del frullatore e sostituire periodicamente le lame;
7) controllare l'efficienza dell'agitatore magnetico;
8) al termine di ogni digestione, controllare la quantità di sedimento non digerito che non deve superare il 5% del peso del campione;
9) utilizzare periodicamente campioni positivi per verificare le capacità e l'attenzione del personale nell'esecuzione del test;
10) il personale del laboratorio che effettua la ricerca delle larve di *Trichinella* deve partecipare a proficency tests almeno una volta all'anno (Forbes e coll., 1998);
11) durante la lettura del sedimento per la ricerca delle larve verificare che la torbidità del liquido non impedisca la lettura;
12) per la lettura del sedimento utilizzare sempre piastre di Petri con griglia sul fondo per poter essere sicuri di aver esaminato l'intero campione;
e 13) dopo l'utilizzo di campioni positivi a scopo didattico o nel caso di positività reale, lavare accuratamente e ripetutamente i contenitori.
Il regolamento 2075/2005 ha introdotto per la prima volta la possibilità di utilizzare un test sierologico per il monitoraggio dell'infestazione da *Trichinella* negli allevamenti suini che hanno ricevuto il riconoscimento di 'liberi da *Trichinella*'. Nell'utilizzo ed esecuzione del test sierologico tenere presente che:
1) gli anticorpi possono essere ricercati sia nel siero che nel succo muscolare;
2) il test può essere utilizzato solo per indagini epidemiologiche o per il monitoraggio degli allevamenti 'liberi da *Trichinella*;
3) non può essere utilizzato per la diagnosi;
4) la concentrazione degli anticorpi nel succo muscolare è almeno 10 volte inferiore a quella del siero e può variare da muscolo a muscolo;
5) la positività deve essere confermata mediante digestione artificiale;
e 6) utilizzare esclusivamente kit commerciali che utilizzano antigene escretore/secretore, non l'antigene crudo.

Conclusioni

Le principali misure per assicurare una produzione di carni suine esenti da parassiti sono l'allevamento dei suini al chiuso con un'alimentazione controllata, l'accesso controllato del personale addetto all'allevamento, il cambio delle calzature e delle tute del personale, e uno stretto controllo per impedire l'accesso agli animali domestici, sinantropici e selvatici.
Sicuramente l'aumento delle produzioni suinicole 'biologiche' dove gli animali hanno accesso all'esterno, rappresenterà un problema per le infezioni ed infestazioni zoonotiche e comporterà un aumento dei controlli sui suini stessi ed un monitoraggio della fauna selvatica specialmente per quanto riguarda *Trichinella*. Il problema di *Toxoplasma gondii* nelle carni suine è molto più complesso e di difficile soluzione anche in

considerazione delle due vie di trasmissione del protozoo, della sua ubiquitarietà e della mancanza ad oggi di metodi semplici e poco costosi per il rilevamento di questo patogeno nelle carni destinate al consumo umano.

Bibliografia

Commissione Europea. Regolamento CE 2075/2005 del 5 dicembre, 2005. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L338, 60-82.

Community Reference Laboratory for Parasites (2006) "Guideline for the detection of *Trichinella* larvae at the slaughterhouse or connected laboratory in a Quality Assurance System" www.iss.it/crlp

Dupouy-Camet J., Murrell K.D. (2007) "FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis" Paris, World Organisation for Animal Health.

Forbes L.B., Gajadhar A.A. (1999) "A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horsemeat" J. Food Prot. 62, 1308–1313.

Forbes L.B., Parker S., Scandrett W.B. (2003) "Comparison of a modified digestion assay with trichinoscopy for the detection of *Trichinella* larvae in pork" J Food Prot. 66, 1043–1046.

Forbes L.B., Rajic A., Gajadhar A.A. (1998) "Proficiency samples for quality assurance in *Trichinella* digestion tests" J. Food Prot. 61, 1396–1399.

Forbes L.B., Scandrett W.B., Gajadhar A.A. (2005) "A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*" Vet Parasitol. 132, 173-177.

Gajadhar A.A., Forbes L.B. (2002) "An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety, with example data on trichinellosis" Vet Parasitol. 103, 133–140.

Gajadhar A.A., Scandrett W.B., Forbes L.B. (2006) "Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level" Rev Sci Tech. 25, 595-606.

Gamble H.R. (1997) "Parasites associated with pork and pork products" Rev Sci Tech. 16, 496-506.

Gamble H.R., Bessonov A.S., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Noeckler K., Schenone H., Zhu X. (2000) "International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption" Vet Parasitol. 93, 393-408.

Genchi C., Pozio E. (2004) "De Carneri, Parassitologia generale e umana", 13° ed., Milano, Casa Editrice Ambrosiana.

Hill D.E., Chirukandoth S., Dubey J.P. (2005) "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals" Anim Health Res Rev. 6, 41-61.

Leclair D., Forbes L.B., Suppa S. Gajadhar A.A. (2003) « Evaluation of a digestion assay and determination of sample size and tissue for the reliable detection of *Trichinella* larvae in walrus meat" J Vet Diag Invest. 15, 188–191.

Linee guida del Ministero della Salute per la corretta applicazione del Regolamento CE 2075/2005 (2007), pp. 1-20.

Pozio E. (2008) "I controlli ufficiali per *Trichinella*" Le Monografie, Alimenti & Bevande (in stampa).

Pozio E. (2007) "World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans" Vet. Parasitol. 149, 3-21.

Pozio E., La Rosa G., Gomez Morales M.A. (2001) “Epidemiology of human and animal trichinellosis in Italy since its discovery in 1887” Parasite 8, S106-S108.
Pozio E., Murrell K.D. (2006) “Systematics and epidemiology of *Trichinella*” Adv Parasitol 63, 367-439.

GESTIONE DEL RISCHIO *TRICHINELLA* E RICONOSCIMENTO UFFICIALE DI AZIENDA ESENTE

ELIO LICATA[1], LUCIA NOCERA[1], GUSEPPE MERIALDI[2], MARCO TAMBA[3]
[1] Servizio Veterinario - Regione Emilia-Romagna; [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale – Sezione RE; [3] Centro Epidemiologico Veterinario Regione Emilia-Romagna

Gli autori hanno contribuito alla attuazione di parti specifiche previste dal Regolamento 2075/2005.

Rischio e controlli

La normativa comunitaria in materia di **alimenti,** Regolamenti (CE) 178/2002, 852/2004 e 853/2004, di **mangimi** (Reg.CE 183/2005) e di **controlli ufficiali** volti alla verifica della loro conformità alla normativa (regolamenti CE 854/2004 e 882/2004), prevede che il sistema dei controlli sia basato su una analisi del rischio, che si attua con la individuazione dei pericoli, del rischio ad essi connesso e analizzando i conseguenti sistemi di gestione. Per comprendere il percorso previsto nel regolamento 2075/2005 è importante richiamare i concetti che concorrono alla analisi e gestione del rischio.

• **Pericolo (hazard): o «elemento di pericolo**», agente biologico, chimico o fisico contenuto in un alimento o mangime, o condizione in cui un alimento o un mangime si trova, in grado di provocare un effetto nocivo sulla salute; (art 3 Reg 178/2002);

• **Rischio (risk):** funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo (art 3 Reg 178/2002)

• **Analisi del rischio (Risk analisis)**: processo costituito da tre componenti interconnesse: valutazione, gestione e comunicazione del rischio (art 3 Reg 178/2002**);**

• **Valutazione del rischio (Risk assesment**): », processo su base scientifica costituito da quattro fasi: individuazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione al pericolo e caratterizzazione del rischio (art 3 Reg 178/2002);

• **Gestione del rischio (Risk management)»**, processo, distinto dalla valutazione del rischio, consistente nell'esaminare alternative d'intervento consultando le parti interessate, tenendo conto della valutazione del rischio e di altri fattori pertinenti e, se necessario, compiendo adeguate scelte di prevenzione e di controllo (art 3 Reg 178/2002);

• **Comunicazione del rischio (Risk Comunication)**», lo scambio interattivo, nell'intero arco del processo di analisi del rischio, di informazioni e pareri riguardanti gli elementi di pericolo e i rischi, i fattori connessi al rischio e la percezione del rischio, tra responsabili della valutazione del rischio, responsabili della gestione del rischio, consumatori, imprese alimentari e del settore dei mangimi, la comunità accademica e altri interessati, ivi compresi la spiegazione delle scoperte relative alla valutazione del rischio e il fondamento delle decisioni in tema di gestione del rischio (art 3.13 Reg 178/2002);

Analisi del rischio (Risk Analysis) Processo che dovrebbe portare ad una scelta consapevole da parte degli "stakeholders" e a **Controlli più efficaci** da parte delle autorità cui compete il controllo.

La trichinella è un RISCHIO

Alla lettera C, capitolo IX, sezione IV, allegato I del Regolamento (CE) 854/2004 del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, la Trichinella spp. viene considerata quale rischio specifico nelle carcasse di suidi (domestici, selvatici d'allevamento, selvatici in libertà), di solipedi e di altre specie esposte all'infestazione da Trichinella. Pertanto è previsto che tali carcasse debbano essere sottoposte ad un esame volto ad individuare Trichinella spp., conformemente alla normativa comunitaria applicabile, **a meno che tale normativa non preveda altrimenti**.

Il Reg. 2075/2005 è la normativa che "prevede altrimenti"

Il Reg. 2075/2005, indica un percorso per attuare una analisi del rischio Trichinella ed una diversa gestione, prevedendo, in funzione di particolari condizioni, di derogare dal controlli sistematico di campioni di carne dalle carcasse di suini domestici, nei mattatoi, nell'ambito degli esami post mortem al fine di individuare la presenza di Trichine. Questo comporterebbe notevoli agevolazioni per l'industria della macellazione di suini senza ridurre la efficacia del controllo sul rischio Trichinella, portando anzi ad una più consapevole gestione sanitaria di tutta la filiera produttiva del settore suinicolo.

Approccio del Regolamento alla valutazione dell'esposizione al pericolo.

1 - ANALISI APPROPRIATE
Per consentire una valutazione del rischio è indispensabile avere a disposizione dati

analitici attendibili. Il percorso per avere questa attendibilità è chiaro e entra temporalmente in vigore in modo obbligatorio **dal 1 gennaio 2006** (data in cui entra in vigore il regolamento)prevedendo:

a) metodologie analitiche approvate
b) svolte in laboratori designati e controllati
c) da personale adeguatamente formato

a) Metodologie analitiche

I metodi di rilevamento sono dettagliatamente descritti nell'allegato I del Regolamento. Nel Cap. I è descritto il metodo di riferimento che è il metodo dell'agitatore magnetico con digestione artificiale di campioni aggregati.
Nel Cap II sono considerati i metodi equivalenti che sono:
metodo di digestione artificiale di campioni aggregati/tecnica di sedimentazione
metodo di digestione artificiale di campioni aggregati mediante assistenza meccanica/tecnica di isolamento mediante filtraggio
metodo di digestione automatica per campioni aggregati.
Per ciascuna metodica sono descritte l'attrezzatura, le modalità di prelievo, la procedura e le azioni conseguenti alla rilevazione di risultati incerti.
Viene anche descritta al Cap III, la tecnica dell'Esame Trchinoscopico il cui utilizzo è soggetta a deroga.

b) Laboratori designati

La designazione dei laboratori che effettuano gli esami ufficiali per trichinella in Regione Emilia-Romagna è demandata ai Responsabili di Area Tecnica di Igiene degli alimenti della ASL competente per territorio. Tale designazione non è da intendersi come un atto autorizzativo, ma semplicemente come la indicazione formale e vincolante, del laboratorio presso cui sono effettuate le analisi per trichinella. Il Responsabile di Area Tecnica di Igiene degli alimenti, concorda con il Veterinario ufficiale responsabile dello stabilimento di macellazione e il rappresentante legale del macello il laboratorio da designare.
Poiché nel corso del 2006 e 2007 sono stati organizzatiin regione emilia romagna due prove interlaboratorio, i laboratori designabili sono tutti quelli che hanno partecipato ai proficiency test regionale e di cui è stato ufficializzato un elenco.

In Regione Emilia Romagna operano ad oggi 31 laboratori designati, di questi:

– 22 annessi a stabilimenti di macellazione
– 9 non annessi (8 IZSLER, 1 A.USL)
– 27 metodiche **AM**
– 8 metodiche **TR**

c) Formazione

Al fine di garantire il rispetto dell'art . 5 del Reg CE 2075/2005, è necessario che i Veterinari ufficiali e il personale operante presso i laboratori nonché i tecnici preposti alla raccolta e alla preparazione dei campioni siano adeguatamente formati.
Le linee guida prevedono che le necessarie competenze siano acquisite attraverso due

interventi formativi distinti:

• Personale laureato

Corso teorico-pratico di 8 ore

parte teorica

– principali conoscenze sull'epidemiologia dei parassiti del genere Trichinella
– nuova legislazione Europea sulla trichinellosi
– conoscenza dei metodi diagnostici e dei punti critici del procedimento diagnostico

parte pratica

– riconoscimento larve di Trichinella sp. dopo digestione artificiale
– riconoscimento larve di Trichinella sp. in tessuto muscolare tramite trichinoscopico
– esecuzione di almeno due metodi diagnostici ammessi dalla nuova legislazione
– prelievo del campione/i per l'analisi
– tracciabilità del campione e della carcassa

• Personale tecnico di supporto

Corso teorico-pratico di 8 ore

parte teorica

– conoscenza dei metodi diagnostici e dei punti critici del procedimento diagnostico

parte pratica

– riconoscimento larve di Trichinella sp. dopo digestione artificiale
– riconoscimento larve di Trichinella sp. in tessuto muscolare tramite trichinoscopio
– esecuzione di almeno due metodi diagnostici ammessi dalla nuova legislazione
– prelievo del campione/i per l'analisi
– tracciabilità del campione e della carcassa

La Regione Emilia-Romagna organizza interventi formativi per il personale laureato. Il personale che partecipa con esito favorevole ai suddetti corsi, inserito in apposito elenco, viene ritenuto idoneo a garantire la successiva formazione per il personale tecnico.
Sono stati organizzati due momenti formativi per personale laureato: 6,7 luglio 2006 e 12,13 dicembre 2007.
Un ulteriore momento formativo viene organizzato annualmente contestualmente alla comunicazione dei risultati dei Ring Test sui laboratori designati in Regione Emilia-Romagna.
Nel corso delle verifiche presso i laboratori è sempre valutata la congruità della formazione ricevuta dagli addetti ai sensi dell'art 5 del regolamento.

Verifiche presso i laboratori designati, ring test e audit

Il coordinatore delle sezioni dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Regione Emilia-Romagna, garantisce per tutte le sezioni che effettuano esami ufficiali per Trichinella, il rispetto dei requisiti previsti al Cap. V delle linee guida nazionali.
Per le altre tipologie di laboratorio, designabili ai sensi del Capitolo V sopraripportato, la verifica dei requisiti è demandata al Responsabile tecnico della Area di Igiene degli alimenti della ASL competente per territorio eventualmente coadiuvato da esperti dell'Istituto Zooprofilattico.
La Regione Emilia-Romagna, poiché i tecnici di laboratorio devono partecipare una

volta all'anno a un "proficiency test" per valutare la sensibilità e specificità del metodo utilizzato all'interno del laboratorio, organizza annualmente, in collaborazione con le sezioni IZS della Regione Emilia-Romagna, un Ring test cui sono tenuti a partecipare tutti i laboratori designati.
Inoltre, utilizzando esperti tecnici, effettua Audit programmati su tali strutture.
• Proficiency test annuale in Regione Emilia Romagna:
– 1° ring test (feb.07: 27 lab., 148 camp.)
– 2° ring test (mag.07: 10 lab., 40 camp.)

Approccio del Regolamento alla valutazione dell'esposizione al pericolo:

2 - PROGRAMMA DI SORVEGLIANZA DELLA FAUNA SELVATICA
Le autorità competenti degli Stati membri nel cui territorio non è stata rilevata, nel corso degli ultimi dieci anni, la presenza di Trichine nei suini domestici possono riconoscere un'azienda come esente da Trichine purché siano rispettate le prescrizioni di cui alla parte A, lettera d) del Cap. II del Regolamento 2075/2005,cioè:
un PROGRAMMA DI SORVEGLIANZA DELLA FAUNA SELVATICA basato sul rischio sia stato messo a punto nelle zone in cui coesistono fauna selvatica e aziende candidate alla qualifica di esenti da Trichine; il programma di monitoraggio ottimizza l'individuazione dei parassiti utilizzando l'animale indicatore e la tecnica d'individuazione più adatti, mediante il campionamento di un ampio numero di animali e il prelievo di campioni di carne quanto più ampio possibile; i parassiti individuati nella fauna selvatica sono identificati secondo la classifica delle specie del laboratorio nazionale di riferimento.
Occorrono dati scientifici sulla presenza e sulla diffusione della Trichinella nella fauna selvatica per potere sostenere che il rischio di infestazione dei suini domestici o dei loro prodotti è trascurabile.
Obiettivo del piano di sorveglianza è la rilevazione del grado di infestazione da trichinella negli animali selvatici individuati come indicatori.
In Emilia Romagna la coesistenza tra suini e cinghiali è limitata. Sorveglianza su altri animali indicatori. Nel 2006 oltre ai cinghiali le trichinelle sono state ricercate in: volpi, cornacchie grigie, taccola.
Tutti gli animali analizzati nel piano sono uccisi nella attività venatoria o in piani di abbattimento programmati ovvero per recupero di carcassa se deceduti. In Emilia Romagna nel corso del 2006 sono stati analizzati n laboratorio designato 3514 cinghiali tutti con esito negativo.

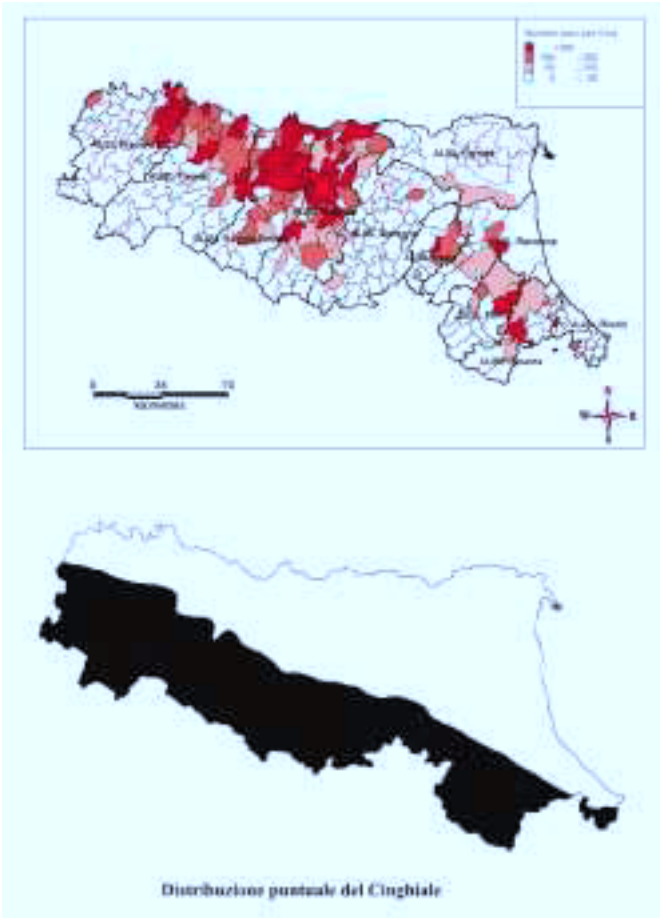
Deroga al controllo sistematico di campioni di carne dalle carcasse di suini domestici
REGOLAMENTO (CE) N. 2075/2005 art. 3 - Riconoscimento delle aziende di suini ufficialmente esenti da Trichinella
In deroga all'articolo 2, paragrafo 1, le carcasse e le carni di suini domestici destinati esclusivamente all'ingrasso e alla macellazione sono esenti dall'esame destinato ad individuare la presenza di Trichine nel caso in cui gli animali provengano da un'azien-

da o una categoria di aziende riconosciute ufficialmente dalle autorità competenti come esenti da Trichine, secondo la procedura indicata nell'allegato IV, capitolo II.

– Da oltre 10 anni non ho casi di trichinella in suini allevati

– Requisiti all'allegato IV, cap I e II del Regolamento

– Piano sorveglianza sui selvatici



Distribuzione allevamenti di suini in Regione Emilia-Romagna

Nelle linee guida per la corretta applicazione del Regolamento 2075/2005, si precisa che i requisiti di tali aziende di cui all'allegato IV, cap I e II del Regolamento, corrispondono in parte a quelli igienico sanitari di cui un'azienda deve essere in possesso per ottenere /mantenere una qualifica sanitaria ed evitare così l'introduzione e la propagazione di malattie infettive, es. malattia vescicolare del suino o malattia di Aujeszky.

Le carcasse di suini domestici destinati all'ingrasso, che provengono da aziende rico-

nosciute ufficialmente esenti da trichine possono derogare dal prelievo sistematico dei campioni per l'esame destinato ad individuare la presenza di trichine al mattatoio, e dagli altri obblighi previsti all'art. 2 del Regolamento, fatto salvo il programma di monitoraggio da attuarsi ai sensi dell'art 11, nonché il controllo sistematico di tutte le scrofe e i verri.
L'azienda esente da *trichine* sarà un allevamento con **"condizioni di stabulazione controllata nei sistemi di produzione integrata", e pertanto il responsabile dell'allevamento tiene sotto controllo permanente le condizioni di stabulazione e l'alimentazione.**
In caso di riconoscimento della azienda come ufficialmente esente si applica un **piano di monitoraggio**: che prevede il prelievo di tutte le scrofe ed i verri, nonché il controllo del 10% dei suini da produzione di ogni partita avviata al macello da azienda riconosciuta ufficialmente esente.
Oltre a ciò, poiché il controllo della trichinella non è più una indagine ispettiva, ma una azione di monitoraggio, la commercializzazione della carcassa non è più vicolata all'esito dell'analisi di laboratorio.

Requisiti per l'azienda di allevamento di suini

Oltre a possedere i requisiti igienico-sanitari l'azienda per ottenere e mantenere il riconoscimento di ufficialmente esente da Trichinella, deve ottemperare agli adempimenti previsti per l'aggiornamento dei dati della anagrafe suina, in particolare: garantire l'inserimento di tutte le informazioni relative al censimento aziendale, che devono essere aggiornate annualmente, e le informazioni relative a tutte le movimentazioni con le modalità previste dalla normativa vigente
Presso l'azienda dovranno essere conservati i modelli di documento in appendice all'allegato I del Regolamento 2074/2005, per la comunicazione delle analisi effettuate presso il macello o laboratorio designato, da cui risulti che i suini della azienda sono controllati in modo sistematico. Per le aziende accreditate il controllo in ottemperanza al programma di monitoraggio prevede il prelievo di tutte le scrofe ed i verri, nonché il controllo del 10% dei suini da produzione di ogni partita avviata al macello
Pertanto le aziende suinicole che si trovino nelle sopraccitate condizioni e che ne abbiano fatto domanda, dopo la verifica da parte dei Servizi Veterinari delle ASL competenti per territorio, potranno ottenere la qualifica che sarà inserita nell'apposita sezione "informazioni sanitarie" nel sito anagrafe suina predisposto dal Ministero della Salute: (https://suini.izs.it).

Procedura per il riconoscimento della qualifica ufficiale di Azienda Esente da Trichine per gli allevamenti di suini

- Istanza del proprietario dell'allevamento
Al fine di ottenere il riconoscimento ufficiale di azienda esente da trichine il proprieta-

rio della azienda dovrà presentare apposita domanda scritta indirizzata al Direttore dell'Area di Sanità Pubblica Veterinaria della ASL in cui si trova l'allevamento.
Nella domanda il proprietario dell' allevamento dovrà dichiarare di ottemperare agli adempimenti previsti per l'aggiornamento della anagrafe dei suini, di conservare i documenti relativi ai risultati delle analisi per la trichinella svolta sui suini macellati ed il rispetto degli obblighi e condizioni previste all'allegato IV, capitolo 1 lettere A e B, secondo il fac simile in allegato 1.
Gli operatori del settore alimentare delle aziende riconosciute come esenti da Trichine informano le autorità competenti nel caso in cui le condizioni di cui al punto A non siano più rispettate o qualora siano intervenuti cambiamenti che possono compromettere la qualifica di azienda esente da Trichine.

- Ispezione delle aziende esenti da trichine
I servizi veterinari effettuano controlli in azienda secondo la check list allegata per verificare la sussistenza dei requisiti necessari al riconoscimento ufficiale. Poiché gli allevamenti riconosciuti possono introdurre solamente animali da allevamenti esenti, i servizi veterinari nella programmazione della attività considereranno prioritari gli allevamenti da riproduzione.
Le ispezioni per verificare la sussistenza dei requisiti dovranno essere effettuate con cadenza almeno annuale.
I risultati del piano di monitoraggio dei selvatici forniscono il supporto per le valutazioni del rischio a livello locale.

- Riconoscimento della azienda
I veterinari che effettuano i sopralluoghi rilevano, tramite la check list elaborata, la situazione strutturale e gestionale degli allevamenti che hanno richiesto la qualifica.
Il Responsabile aziendale di Area tecnica di Sanità Animale, in caso di rilevazione non conforme di alcuni aspetti della check list effettua una valutazione del rischio tenendo in considerazione le seguenti indicazioni:
1) manutenzione delle strutture di allevamento: con particolare riguardo a:
– continuità degli impianti di raccolta delle deiezioni: tombini e tubature fuori dai reparti ove albergano i suini dovranno essere chiusi o protetti.
– assenza di materiali di deposito a ridosso dei ricoveri di animali - Si considera fondamentale mantenere libera da impedimenti, pulita e coperta da ghiaia o con l'erba sfalciata, una area larga 2 metri tutt'intorno ai reparti dove albergano i suini.
– Chiusura dei "buchi" od altre aperture ove non passa personale o suini (escluse finestre o aperture per aerazione)
– Protezione contro grandi uccelli carnivori: sul territorio regionale, si considera congrua, come barriera architettonica per impedire l'accesso a grandi uccelli carnivori od onnivori, una idonea copertura dei parchetti esterni (per es. tettoia).
2) igiene della conservazione e somministrazione dei mangimi
3) idoneità delle procedura di derattizzazione e lotta agli insetti
4) presenza di recinzione continua e congrua: tale requisito è fondamentale ai fini della biosicurezza dell'allevamento. La recinzione congrua dovrà prevedere almeno

tutta l'area in cui si svolgono operazioni con gli animali e garantire che sia impedito ad altri animali l'accesso dall'esterno all'area di allevamento.
Le indicazioni sopra riportate sono desunti direttamente dalla definizione di allevamento ufficialmente esente, indicati del Regolamento 2075/2005, cui si deve sempre fare riferimento:
– **condizioni di stabulazione controllata**
– **il responsabile dell'allevamento tiene sotto controllo permanente le condizioni di stabulazione e l'alimentazione**.
Qualora siano garantiti i requisiti sufficienti, il Responsabile aziendale di Area tecnica di Sanità Animale assegna all'allevamento la qualifica richiesta.
In ogni momento la rilevazione di una non conformità può comportare la sospensione della qualifica ed il conseguente il ritorno al controllo sistematico di tutti i capi macellati. In tali casi il Servizio Veterinario effettua formale comunicazione al detentore e aggiorna la qualifica nella BDN suini.
Attraverso la comunicazione dei risultati del piano di sorveglianza dei selvatici la regione fornisce dati utili alla valutazione del rischio e qualora si riscontri positività negli animali indicatori la qualifica è mantenuta solo dagli allevamenti che garantiscono il massimo rispetto dei requisiti.

– *Inserimento della qualifica nella BDN suina*
La registrazione delle qualifiche sanitarie in BDN deve essere svolta secondo le procedure indicate dalla BDN suina e tenendo conto delle indicazioni riportate nella nota del Ministero della Salute del 17 ottobre 2007 "Qualifiche sanitarie: Rettifiche".

Ispezione della azienda

Per iniziare il percorso di riconoscimento delle aziende è stato concordato con alcune regioni collegate territorialmente e funzionalmente per la attività di allevamento dei suini, una check list su cui basare i controlli dei Medici Veterinari delle ASL, per il rilascio della qualifica. Il percorso di riconoscimento delle aziende non è, in effetti, ancora iniziato e, ovviamente potrà essere prevista una verifica della attuabilità della procedura individuata.

CHECK LIST PER ISPEZIONE DEL'ALLEVAMENTO

RICONOSCIMENTO DI AZIENDA ESENTE DA TRICHINE	**Evidenze raccolte**
BDN ANAGRAFE SUINA E RISPETTO PROGRAMMA DI MONITORAGGIO	
L'orientamento produttivo dell'allevamento è congruente rispetto all'indicazione presente in BDN (produzione/ ingrasso; riproduzione ciclo chiuso; riproduzione ciclo aperto)	
La registrazione delle movimentazioni in BDN suina è effettuata entro sette giorni dall'evento.	
La comunicazione del censimento effettuata nel mese di marzo di ogni anno corrisponde ai dati registrati sul registro di carico e scarico. Censimento: animali detenuti al 31 marzo, suddivisi per categoria.	
Presso l'azienda sono conservati i modelli di documento in appendice all'allegato I del Regolamento 2074/2005, per la comunicazione dei risultati delle analisi effettuate presso il macello o laboratorio designato, da cui risulti che i suini della azienda sono soggetti ai controlli previsti.	
REQUISITI ALLEGATO IV, CAP I E II DEL REGOLAMENTO 2075/05	
Sono adottate tutte le precauzioni pratiche relative alla costruzione e alla manutenzione degli edifici per impedire ai roditori, ad altri tipi di mammiferi e a grandi uccelli carnivori l'accesso agli edifici nei quali sono tenuti gli animali	Le precauzioni pratiche, sono: - corretta costruzione e manutenzione dei sistemi di raccolta ed allontanamento delle deiezioni. - eliminazione di soluzioni di continuità nelle pareti e nelle condutture. Le necessarie aperture per il passaggio dei tubi o per la aerazione saranno opportunamente protette. - corretta costruzione e manutenzione di recinzione. Si considera ottimale la recinzione metallica di altezza minima di 180 cm, interrata ad una profondità di 30 cm. L'area di allevamento da recintare, di norma, comprende una zona larga almeno 2 metri tutt'intorno ai reparti dove albergano i suini. Sono tuttavia da ritenersi idonee altre forme approvate dal Servizio Veterinario, che impediscono agli animali l'accesso esterno all'area di allevamento, individuate sulla base dell'analisi del rischio locale.Le barriere architettoniche per impedire l'accesso a grandi uccelli carnivori od onnivori potranno basarsi su tettoie, reti od altro, in funzione della collocazione geografica dell'allevamento e la presenza di selvatici.
Esiste una procedura di applicazione di un programma di lotta contro i parassiti, in particolare roditori, in modo da prevenire l'infestazione dei suini.	La procedura ed il programma di lotta contro i roditori prevederà l'utilizzo di tutti i possibili mezzi ed una costante ricognizione della integrità degli edifici.

Viene conservata la documentazione relativa all'attuazione del programma per le verifiche di idoneità della procedura da parte della autorità competente	
Tutti i mangimi utilizzati provengono da stabilimenti di produzione registrati/riconosciuti ai sensi regolamento n. 183/2005/CE.	Verifica dei requisiti indicati nel Regolamento 183, riguardo la somministrazione e detenzione in allevamento dei mangimi.
I mangimi sono conservati in silos chiusi o in altri contenitori inaccessibili ai roditori.	Oltre alle modalità di conservazione si verificheranno le modalità di distribuzione dell'alimento. Le mangiatoie saranno collocate in luoghi non facilmente accessibili ai roditori, ad uccelli od altri animali. Importante è anche la costante e frequente pulizia degli impianti per la distribuzione dei mangimi e di tutte le attrezzature o automezzi utilizzati a questo scopo.
Tutti gli altri prodotti utilizzati come alimento per gli animali, sono sottoposti a trattamento termico o sono comunque prodotti e immagazzinati nel rispetto delle disposizioni dell'autorità competente	
Le carcasse degli animali morti sono rimosse dai locali di allevamento entro 24 ore dal decesso ed eliminate conformemente alle disposizioni sanitarie. Qualora le carcasse dei lattonzoli siano immagazzinate nei locali di allevamento, i contenitori utilizzati sono adeguatamente sigillati ed idonei alla conservazione, in attesa dello smaltimento.	I contenitori in cui conservare, preferibilmente tramite il freddo, le carcasse di animali morti in attesa del loro allontanamento, troveranno la loro collocazione in prossimità dell'accesso, in una area dell'allevamento lontana da dove albergano gli animali. (se possibile all'esterno del perimetro recintato). L'area limitrofa ai contenitori sarà idonea alla loro pulizia e disinfezione, mediante idonea attrezzatura.
Se l'allevamento è situato nelle vicinanze di una discarica, sono adottate misure per contenere il rischio connesso alla presenza della discarica.	
Tutti i suini presenti in allevamento sono identificati in modo che sia possibile la tracciabilità.	
sono introdotti animali nell'azienda soltanto nel caso in cui: i) provengano da aziende ufficialmente riconosciute come esenti da Trichine, ovvero ii) siano accompagnati da un certificato autenticato dall'autorità competente nel paese di esportazione dal quale risulti che l'animale proviene da un'azienda riconosciuta come esente da Trichina; ovvero iii) siano tenuti isolati fino a quando i risultati di un test sierologico approvato dal laboratorio comunitario di riferimento si rivelino negativi. Il campionamento sierologico deve iniziare soltanto dopo che gli animali abbiano trascorso quattro settimane nell'azienda	
nessun suino destinato alla macellazione può avere accesso a strutture esterne al perimetro dell'allevamento durante il periodo di produzione.	
lo svezzamento dei suinetti avviene in ambiente controllato.	La presenza di parchetti all'aperto non preclude l'accreditamento della azienda.

ATTI DEL MEETING ANNUALE S.I.P.A.S.

ERADICAZIONE DELLE MALATTIE

Salsomaggiore Terme (PR),13-14 marzo 2008

ELIMINAZIONE DELLE MALATTIE RESPIRATORIE SUINE PROSPETTIVE NEGLI USA

SPENCER R. WAYNE, DVM
Clinica veterinaria Pipestone e Università del Minnesota

Le malattie respiratorie costano caro agli allevatori di suini. Negli USA si stima che la PRRS influenzi la crescita e la mortalità dei suini per una cifra pari a 572 milioni di USD ogni anno[1]. Altre patologie respiratorie sembrano influire allo stesso modo sui suini in crescita (soprattutto l'influenza suina e la polmonite micoplasmatica). Tali patologie sono inoltre molto diffuse e hanno carattere endemico in tutta l'America, in cui la vaccinazione, la cura e le misure basiche di biosicurezza non sono sufficienti a controllarne completamente la diffusione. Le tecniche di eliminazione attuate hanno avuto esito positivo, ma lo spettro di una nuova infezione preoccupa tantissimi allevatori, in quanto il pericolo di diffusione aerea[2-4] richiede un nuovo approccio all'eliminazione della malattia.

Gli allevamenti di suini sono distribuiti sul territorio in modo irregolare a causa delle differenze tra disponibilità di terreni (Figura 1), delle condizioni normative, della vicinanza alle forniture di mangime e delle tradizioni agricole. La concessione di licenze per strutture da allevamento è soggetta all'ottenimento di una serie di autorizzazioni che variano dal livello comunale (un'area di circa ~88 Km^2) a quello della contea al contesto statale. Queste varie unità locali presentano amministrazioni diverse e approcci di diverso tipo nei confronti degli allevamenti e, di conseguenza, normative diverse

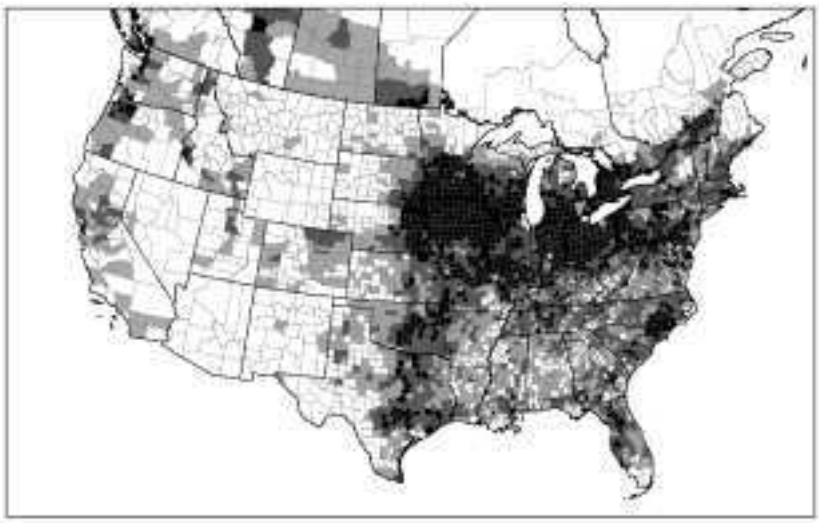


Figura 1. Mappa quartile relativa alla densità degli allevamenti di suini negli USA e Canada. Le aree più scure indicano una maggiore densità.

in merito alla creazione di allevamenti. Gran parte del mais e della soia prodotti negli Stati Uniti vengono coltivati nella zona del Midwest (soprattutto in Iowa e Illinois) e, pertanto, è in quelle zone che la creazione di allevamenti viene maggiormente incoraggiata. Nonostante la poca disponibilità di mangimi, invece, il settore dell'allevamento di suini è cresciuto esponenzialmente negli anni '90 nel Nord Carolina, con produttori sono legati a un unico proprietario collettivo. Di conseguenza sono sorti grandi allevamenti suini in una zona geograficamente concentrata (Figura 2) con frequenti spostamenti reciproci di animali. Nel Minnesota, gli allevamenti suini vengono registrati in database pubblici con accuratezza e precisione discutibili. Nelle due contee del MN risulta effettivamente documentato solo l'84% degli allevamenti, mentre, di questi, solo il 41% è di fatto operante. Negli ultimi decenni la struttura dell'allevamento si è gradualmente trasformata dall'essere un sito produttivo unico a sito di produzione multiplo[5]. Di conseguenza, sempre più maiali vengono spostati (spesso su grandi distanze) da un allevamento all'altro prima dell'ultimo trasferimento per la macellazione. Le dimensioni dei trasferimenti (volume, distanza e frequenza) tra gli allevamenti sono impressionanti. Nelle stesse due contee del Minnesota, il chilometraggio percorso per lo spostamento dei maiali ammonta a 1.895 km (Figura 3). I registri dei movimenti tra Stato e Stato indicano che il 10% circa dei trasferimenti da e verso il MN sono >1.000 km (Figura 4). A causa della concentrazione geografica degli allevamenti, del trasferimento frequente e l'ampio raggio degli animali all'interno degli USA e della facilità di trasmissione di vari patogeni respiratori, l'eliminazione delle malattie respiratorie è più complicata di quanto non potrebbe sembrare all'apparenza.

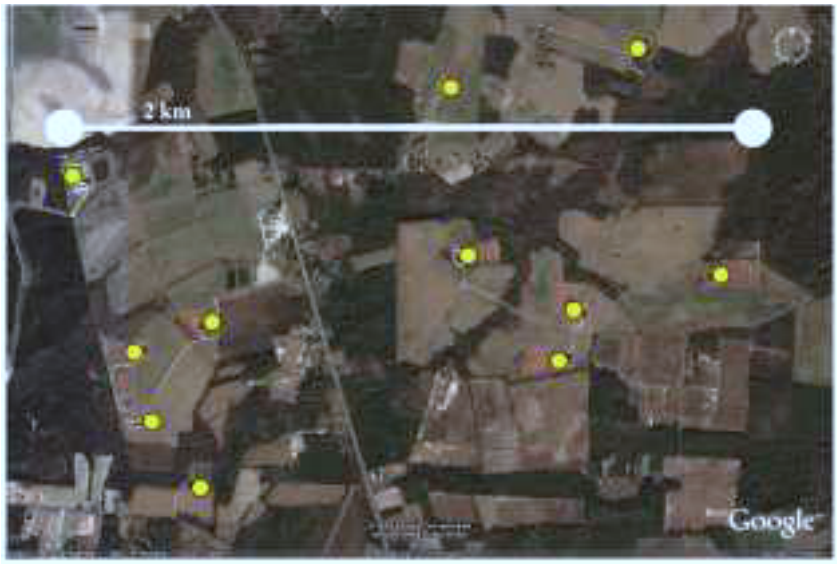


Figura 2. Esempio di densità degli allevamenti di suini nel Nord Carolina: 11 impianti in un area di 4km2. In ciascuno di essi si allevano da 2.000 a 10.000 unità.

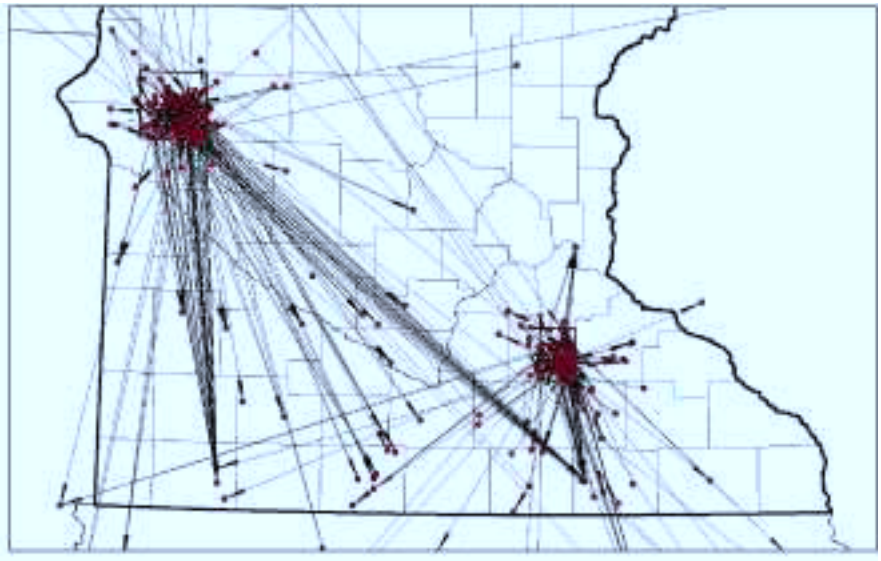


Figura 3. Flusso annuale di trasferimento dei maiali nelle due contee del Minnesota. Le frecce indicano il trasporto di animali da riproduzione, animali in fase di crescita e animali destinati al macello.

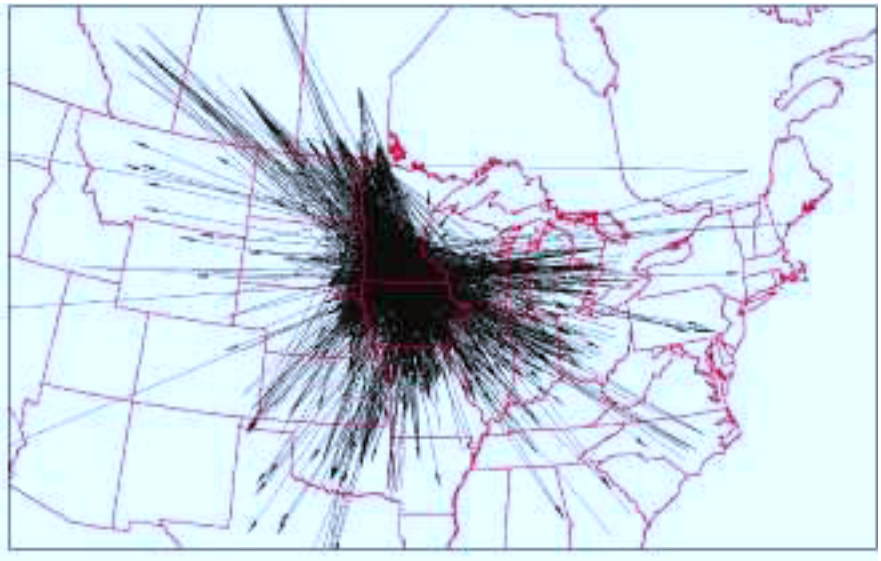


Figura 4. Flusso annuale di trasferimento di suini tra Stati (da e verso il Minnesota). Le frecce indicano il trasporto degli animali da riproduzione e degli animali in fase di crescita.

L'eliminazione di alcuni patogeni respiratori (PRRS e micoplasma) si è ottenuta rapidamente tramite lo spopolamento e, più recentemente, la segregazione delle mandrie[6, 7]. Per l'eliminazione della PRRS, un metodo comunemente adottato consiste nell'esporre

tutta la mandria al virus "internamente" (comprese le femmine incinte) tramite l'iniezione di virus+ siero titolato e l'esclusione di nuove unità dalla mandria per un periodo di quattro-sei mesi. Nella maggioranza dei casi il virus non è rilevabile (per PCR) nei maiali svezzati otto settimane dopo l'esposizione al virus, mentre i cuccioli vengono portati in allevamento senza alcuna successiva sierconversione al virus del PRRS. Il successo della tecnica per l'eliminazione della PRRS si è ripetuto in molti altri allevamenti del Midwest. Più raramente, ma con diverse esperienze positive registrate, si è praticata l'eliminazione della polmonite micoplasmatica tramite la medicazione strategica (che comprende normalmente tilosina, tiamulina o clorotetraciclina) e l'iperimmunizzazione (mediante vaccino commerciale) seguita dalla segregazione della mandria. Dopo l'eliminazione della PRRS, gli strumenti attualmente utilizzati per la prevenzione di una nuova diffusione del virus comprendono l'adozione di programmi di biosicurezza e il filtraggio dell'aria in entrata. È stato dimostrato che il filtraggio dell'aria tramite filtri 95DOP aiuta a prevenire la trasmissione della PRRS per via aerea all'interno dello stesso allevamento e anche la trasmissione dell'influenza suina. Nelle ricerche attualmente condotte presso l'Università del Minnesota si sta studiando l'influenza delle condizioni atmosferiche (meteorologiche) sulla trasmissibilità aerea del virus della PRRS. I risultati delle prove indicano che la cura preventiva di base tramite 'Danish Entry' e il filtraggio dell'aria aiutano a prevenire la trasmissione della PRRS a maiali distanti 120 metri per un periodo di oltre un anno[8].

Per comprendere meglio il modo in cui i ceppi di PRRS si trasmettono di allevamento in allevamento si utilizza la sequenza genetica[9] ORF5 per caratterizzare i virus e stabilire quali sono le cause comuni. Inoltre, agli sforzi degli epidemiologi vengono in aiuto strumenti GIS (da GoogleEarth a ArcGIS) nella comprensione dei rischi di infezione a livello locale e più esteso. Gli strumenti di questo tipo possono essere semplici da usare e disponibili gratuitamente oppure più potenti, costosi e complessi: in qualsiasi caso, le informazioni che offrono sono spesso illuminanti per chi li utilizza. A questo punto gli ostacoli da superare non sono più tecnologici, ma sociologici. La messa in atto di rapporti of formali, multi-parte e cooperativi per la condivisione dei dati consentirebbe di ottenere ricerche epidemiologiche più fruttuose[10], coinvolgerebbe gli allevatori in maggior misura e porterebbe maggiori consensi in tutto il settore.

Non potendo prevedere la disponibilità di un vaccino efficace nel prossimo futuro, i produttori commerciali stanno decidendo con sempre maggior vigore di NON vivere con la PRRS. La facilità di eliminazione della PRRS tramite la segregazione della mandria risulta parzialmente vanificata dalla facilità di reinfezione, ma la disponibilità di seme negativo alla PRRS (come nuovo standard) tramite filtraggio dell'aria ha già consentito di eliminare parte del rischio dalle unità femmine. Molti allevatori che operano nelle aree a maggiore concentrazione stanno seriamente prendendo in considerazione l'adozione del filtraggio per ridurre ulteriormente il rischio di contagio da parte degli allevamenti vicini. Inoltre, l'adozione di diagnosi più approfondite ha consentito di aumentare le comunicazione con i vicini, mentre con l'applicazione di tecniche di mappatura basiche i maiali negativi alla PRRS vengono gradualmente spostati in ambienti a più basso rischio di infezione. Queste operazioni aiutano a ridurre la gravità delle malattie respiratorie da PRRS dei maiali durante la crescita. Infine l'adozione di

metodologie regionali di documentazione dei siti di produzione, diagnosi e conoscenza dei flussi di unità consentirà di cacciare la PRRS dal "quartiere". I recenti successi ottenuti in una contea del Minnesota si stanno espandendo alle regioni vicine. I futuri progressi in questo senso porteranno sicuramente a un esito positivo di questa battaglia in difesa degli interessi degli allevatori.

Bibliografia

1. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. J Am Vet Med Assoc. 2005;227(3):385-392.
2. Stark KD. The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. Vet J. 1999;158(3):164-181.
3. Hermann J, Hoff S, Munoz-Zanzi C, et al. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. Vet Res. 2007;38(1):81-93.
4. Cho JG, Dee SA, Deen J, et al. The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. Can J Vet Res. 2006;70(4):297-301.
5. 2002 Census of Agriculture - Volume 1 Geographic Area Series Census, State - County Data Available at: http://www.nass.usda.gov/Census/Create_Census_US_CNTY.jsp. Accessed 11/6/2006, 2006.
6. Torremorell M, Henry SC, Christianson WT. Eradication Using Herd Closure, 2003 PRRS Compendium, Chapter 10: Field Experiences with Different Methods of Controlling PRRS Virus. 2003:111-115.
7. Schneider P. Mycoplasma hyopneumoniae eradication in a large system: strategies and techniques, in Proceedings of the 2006 Allen D. Leman Swine Conference. 200682-86.
8. Dee SA. Current research results on area spread of PRRS virus between farm sites. 2008;Personal Communication.
9. Christopher-Hennings J, Faaberg KS, Murtaugh MP, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. J Swine Health Prod. 2002;10(5):213-218.
10. Davies P, Munoz-Zanzi CA, Morrison RB. Approaching Regional Control of Disease – Integrating Research and Technology, International Symposium on Swine Disease Eradication (2004), in 20041-8.

LA DISSENTERIA SUINA: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSI E CONTROLLO IN REPUBBLICA CECA

J. SMOLA E A. CIZEK
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Introduzione

Nella Repubblica Ceca si è registrato un notevole aumento nel numero di allevamenti suini con casi clinici di Dissenteria suina negli ultimi 10 anni. Inoltre a causa del diffondersi di antibiotico resistenze dal 1999, il range di farmaci di prima scelta per la Dissenteria è stato limitato alle sole pleuromutiline. Al contrario dei paesi dell'Unione Europea, dove la valnemulina è stata temporaneamente ritirata dopo la prima registrazione, in Repubblica Ceca è stato approvato l'uso di questo farmaco in modo continuativo a partire dalla sua registrazione nel novembre del 1998. Una situazione economica sfavorevole per la produzione suina, ha fatto sì che le pleuromutiline venissero somministrate a bassi dosaggi terapeutici o che venissero utilizzate tiamuline generiche meno costose. L'attuale situazione epidemiologica ha portato recentemente alla necessità di abbandonare l'utilizzo preventivo delle pleuromutiline in profilassi riservandone l'impiego alla solo terapia. Infatti l'utilizzo profilattico implica dosaggi minori rispetto a quelli utilizzati per la terapia e può favorire l'insorgenza di nuovi cloni di *B. hyodysenteriae* ed è molto alta la probabilità che ci sia un legame tra i dati non favorevoli riguardanti le MIC degli antidissenterici e il loro uso intensivo come profilassi.

Virulenza di *Brachyspira hyodysenteriae*

Il principale obiettivo della ricerca finalizzata alla lotta alla Dissenteria suina (SD) è quello di identificare i fattori responsabili della virulenza del patogeno, ed anche quello di identificare gli antigeni protettivi che possano essere utilizzati per produrre vaccini. Il problema, non ancora superato nonostante le moltissime ricerche effettuate sia in Europa che in Australia, è la mancata differenziazione tra i ceppi a diversa virulenza a livello molecolare, per poter identificare i maggiori fattori di virulenza.
Per superare il problema, sarebbero particolarmente necessari ceppi con una mutazione genetica sviluppata in modo specifico, ad esempio per la produzione di emolisina/e. Scoperta molto tempo fa e considerata uno dei maggiori candidati per la virulenza, la citotossina (beta emolisina) rimane poco conosciuta, specialmente dal punto di vista della patogenesi molecolare dell'infezione. Oltre la tossina, altri fattori chiave di virulenza sono rappresentati dalle strutture presenti sulla superficie delle spirochete, responsabili dell'adesione dei ceppi agli enterociti del colon. Il loro ruolo nel processo patogenetico non è stato ancora chiarito. Vista la mancanza di questi dati fondamentali, sono stati messi a punto metodi che permettono il rilevamento della virulenza degli isolati nel loro complesso in un modello sperimentale suino. Recenti infezioni speri-

mentali nel suino in Svezia e Australia hanno confermato le differenze nell'infettività tra il ceppo di *B. hyodysenteriae* B204, usato comunemente fino ad ora a livello internazionale, ed il ceppo di recente isolamento X 384. Nelle sperimentazioni, il ceppo più frequentemente utilizzato finora, B204 ha indotto infezione in 20 suini (65%) su 31 con un periodo di incubazione compreso tra 7 e 31 giorni, mentre il ceppo nuovo, isolato in Australia, provoca infezione nel 100% dei casi , e il suo periodo di incubazione è risultato molto breve (5.3 giorni in suini infettati in modo diretto e 7.5 in quelli sentinella). Nonostante l'infettività di molti dei ceppi di campo isolati sia molto inferiore a quella di questi ceppi di *B. hyodysenteriae* selezionati, le infezioni avvengono con regolarità negli allevamenti. Quindi c'è un'alta probabilità che la presenza di qualche altro fattore predisponente, come ad esempio un'alta percentuale di semi di soia nella razione, sia necessaria perchè ci sia un focolaio di Dissenteria suina con la caratteristica sintomatologia clinica. Abbiamo confermato di recente questo assunto in una nostra sperimentazione nella quale il ceppo B204 non ha provocato Dissenteria in 20 suini convenzionali che erano stati alimentati con una dieta priva di semi di soia. Nella sperimentazione successiva, che ha previsto l'uso dello stesso ceppo e della stessa dose infettante, una singola modificazione, ad esempio l'introduzione di alimento contenente soia una volta al giorno, ha avuto come esito le manifestazioni cliniche di SD da infezione nel 70% dei suini. La patogenesi della SD non è ancora del tutto compresa, ad ogni modo è probabile che sia multifattoriale e che coinvolga l' interazione tra *B. hyodysenteriae* e l'ambiente del grosso intestino del suino. I principali fattori che potrebbero predisporre i suini in allevamento all'infezione includono fattori stressanti come il trasporto, i cambiamenti nell'alimentazione, la pavimentazione continua e l'utilizzo di lettiera, *etc*. In particolare dovrebbero essere considerati la composizione della razione e i fattori associati all'aumento della quantità e/o della qualità delle sostanze che arrivano al grosso intestino.

Malattia e diagnosi

La principale manifestazione clinica della forma tipica della malattia acuta è una diarrea muco-emorragica che dura alcuni giorni ed è seguita da diarrea per 2 - 14 giorni. Alcuni dei suini infetti, comunque, non manifestano questa tipica sintomatologia, e, sia in condizioni standard in allevamento che in condizioni sperimentali, soffrono solo di sintomi più leggeri con una diarrea non emorragica. Dal punto di vista diagnostico, l'informazione più importante è che i suini sintomatici diffondono la *B. hyodysenteriae* in modo continuo durante l'intero periodo diarroico. Dopo la guarigione la consistenza delle feci torna normale. In media, l'eliminazione s'interrompe 8 giorni dalla guarigione, ma alcuni suini possono continuare a diffondere l'agente patogeno, solitamente in modo irregolare e in quantità che possono essere inferiori al limite utile per l'isolamento o per essere rilevate dalla PCR. In alcuni casi l'isolamento ha successo nonostante non sia rilevabile alcuna evidenza di infezione enterica. Questo accade frequentemente in associazione alla somministrazione di antibiotici diversi dalle pleuromutiline o con dosaggi terapeutici di pleuromutiline troppo bassi.

L'utilizzo di un terreno selettivo per l'isolamento è ancora un punto molto importante per il rilevamento di *B. hyodysenteriae*. L'isolamento rimane il *golden standard* per la conferma della diagnosi di SD, dato che la PCR manca della sensibilità necessaria per l'analisi delle feci. La diagnosi basata sulla PCR è stata descritta come un metodo adatto per i campioni fecali con positività elevate (25.5-31.1%) in Germania dove, negli allevamenti con SD endemica, è stato a volte riportato un decorso asintomatico della malattia senza diarrea visibile. Contemporaneamente, in un'indagine fatta in Repubblica Ceca e focalizzata sui suini non diarroici o sugli animali senza una diarrea acuta, è stato approvato l'isolamento come metodo più sensibile per la ricerca di *B. hyodysenteriae*. In questo studio singoli tamponi fecali sono stati prelevati da 18 suini in finissaggio, senza sintomi clinici di diarrea, provenienti da ognuno dei 22 allevamenti scelti casualmente. *B. hyodysenteriae* è stata isolata mediante metodo colturale in 3 (13.6%) dei 22 allevamenti monitorati, così come *Salmonella enterica*, inoltre *L. intracellularis* è stata individuata mediante PCR in tamponi rettali di suini provenienti da 7 allevamenti (31.7%).
Similmente all'ileite, che è solitamente un'infezione subclinica, la diagnosi sierologica applicata alla SD può aumentare la possibilità di rilevare le forme croniche e subcliniche della malattia negli allevamenti. Sfortunatamente, non esistono kit in commercio per la ricerca degli anticorpi specifici nei confronti di *B. hyodysenteriae*, a causa della cross-reattività con gli anticorpi contro gli antigeni di altre brachispire. Basandosi sui risultati di molti studi preliminari, è probabile che verrà messo a punto un test per la ricerca di anticorpi sierici contro il solo antigene BmpB, o verso la proteina ricombinante Bhlp. Una nuova metodica (ELISA) potrebbe rendere possibile l'introduzione di una sierologia d'allevamento per la dimostrazione della Dissenteria suina. Potrebbe essere particolarmente utile come screening nel caso in cui l'agente eziologico non venga individuato durante la fase sintomatica, e/o quando il quadro clinico sia atipico o al momento dell'acquisto di animali in particolare da allevamenti produttori di GGP (*nucleus herd, NH)* . Questo potrebbe essere molto utile anche per il controllo e l'eradicazione della Dissenteria suina e per la creazione di allevamenti SD-free.
Al fine di capire meglio le potenzialità di un eventuale test sierologico, abbiamo valutato alcuni risultati, di prossima pubblicazione, ottenuti mediante un nuovo immunoblotting sierologico della SD. Come potevamo attenderci sono state trovate (con frequenze differenti) scrofe sierologicamente positive in tutti (9) gli allevamenti con presenza di SD documentata nel tempo (1-10 anni) con l'eccezione di un allevamento nel quale la SD è stata eradicata mediante una medicazione di massa dell'intero allevamento con tiamulina nel 2001. In 4 allevamenti senza precedenti storici di SD, sono state identificate solo 4 scrofe sierologicamente positive sulle 130 analizzate. Tutte queste scrofe positive provenivano da un *nucleus herd* (200 scrofe) dove *B. hyodysenteriae* era stata già isolata mediante coltura da feci 6 mesi prima del prelievo di siero. In questo NH durante le successive indagini epidemiologiche 4 scrofette su 29 esaminate (13.8%) risultavano sierologicamente positive. Inoltre, è molto importante sottolineare che in suini provenienti da due NH (approssimativamente di 400 scrofe) e da un grosso allevamento a ciclo chiuso (2500 scrofe), tutti senza alcun precedente di SD, nessuno dei campioni di siero prelevati mostrava positività sierologica.

Conclusioni

Il grado di sensibilità di molte metodiche diagnostiche dirette usate oggi, non permette di rilevare in modo affidabile che un singolo animale è un portatore latente di *B. hyodysenteriae*. Queste metodiche non sono in grado di identificare la Dissenteria suina a livello dell'allevamento, specialmente quando gli animali non manifestano alcun sintomo di diarrea. Gli approcci di diagnosi diretta falliscono anche nel caso in cui i suini siano trattati con antimicrobici somministrati nell'alimento o nell'acqua di bevanda. In un futuro prossimo speriamo di poter essere in grado di identificare gli allevamenti SD- positivi verificando la presenza di anticorpi specifici contro *B. hyodysenteriae*.

Epidemiologia della Dissenteria suina

Storia in Repubblica Ceca

Le Autorità Veterinarie pubbliche della Repubblica Ceca hanno monitorato l'incidenza di SD dal 1978. Circa 10 anni dopo, l'incidenza è diminuita a meno di 10 casi l'anno. Durante la prima metà degli anni Novanta, in seguito alla liberalizzazione del commercio, il numero degli allevamenti con forme cliniche di SD è aumentato di 4 volte arrivando fino a 40 casi l'anno (fig. 1).

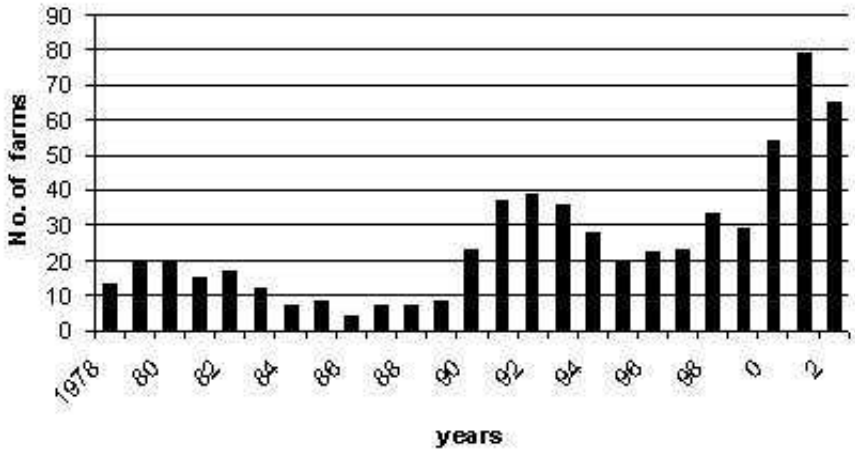


Fig. 1. Numero di allevamenti suini in Repubblica Ceca dove sono stati identificati nuovi casi di Sd durante il periodo 1978-2003 (Lobová *et al.*, 2004).

La prima ondata di SD seguì l'eliminazione della SD dalla lista delle patologie contagiose (nel 1995) soggette a obbligo di denuncia. Il mercato suinicolo divenne libero e gli allevamenti cominciarono a tener nascoste eventuali informazioni sulla presenza di

SD nei loro allevamenti e/o minimizzare il reale impatto per lo stato sanitario dei suini infetti. Il maggior aumento di incidenza (seconda ondata di SD) comunque, venne osservato più tardi (dopo il 1998), quando i nitrimidazoli e il promotore di crescita olaquindox (che ha degli effetti antidissenterici) e in particolare la salinomicina vennero banditi per il trattamento della SD. Fino a quel momento la lincomicina, la tiamulina e, a volte, la tilosina venivano usati routinariamente come farmaci di scelta nel trattamento della SD, ma anche nella profilassi a bassi dosaggi in alcuni allevamenti, senza particolari attenzioni all'insorgenza di antibiotico-resistenze. La situazione epidemiologica, comunque, peggiorò nel 1999 e, in particolare, pochi anni dopo (2001-2003) con un picco nel 2003, quando circa 80 allevamenti vennero identificati come positivi per SD.

Situazione attuale

Il numero di allevamenti cechi con SD è rimasto molto alto a partire dal 2001 fino ad oggi. La Dissenteria suina si è diffusa nella maggior parte degli allevamenti convenzionali (a ciclo chiuso) e nelle unità di finissaggio con una capacità compresa tra 5000 e 25000 suini. Tra questi allevamenti convenzionali con SD ci sono stati importanti casi dovuti a isolati di *B. hyodysenteriae* multiresistenti. Il nostro primo isolamento è avvenuto in corso di casi clinici trattati con tiamulina nell'alimento, in un allevamento con una capacità di 15-20000 ingrassi e 800 scrofe. Vista la situazione proponemmo un programma che prevedeva misure urgenti per il controllo e l'eradicazione della SD, appoggiato dalle autorità veterinarie statali, ma rifiutato dal proprietario e dal veterinario dell'allevamento. Questi ultimi provarono a controllare la malattia attraverso cambi di personale (nuovi operato tori e varie sostituzioni del veterinario aziendale), farmaci (nell'alimento, nell'acqua di bevanda) o programmi alimentari con vari additivi. Ciò nonostante il ceppo multiresistente isolato in precedenza continuò a sopravvivere in allevamento per più di tre anni (secondo il nostro monitoraggio) fino alla fine, quando l'allevamento fu costretto a chiudere per insolvenza. Questa esperienza negativa spostò la nostra attenzione alla ricerca di allevamenti con la patologia in forma endemica, nei quali i ceppi isolati mostrassero una ridotta sensibilità alle pleuromutiline. Il caso successivo di isolamento di ceppi multiresistenti si osservò in sei allevamenti nel 2000. Questi allevamenti, comparati al primo, erano più piccoli (200-300 scrofe) con cicli continui e somministravano i medicinali nell'alimento. Bisogna sottolineare, che i nostri colleghi stavano riportando una ridotta efficienza clinica di entrambe le pleuromutiline utilizzate per il trattamento della SD, nonostante un aumento dei dosaggi ed anche dopo iniezione di tiamulina. Il test di sensibilità dei ceppi isolati da suini con diarrea sotto trattamento, mostrò una diminuita sensibilità alla tiamulina ed anche alla valnemulina con MIC $\geq$ 16.0 mg/l. Da quel momento focalizzammo la nostra attenzione sugli allevamenti dove l'efficacia delle pleuromutiline si era dimostrata più bassa o del tutto fallimentare. Per l'interpretazione che ci eravamo preposti di fare, si decise che il criterio di selezione, per indicare una diminuita sensibilità di entrambe le pleuromutiline, fosse una MIC $\geq$ 8.0 mg/l. Il maggior numero di allevamenti (19), dai quali venivano isolati ceppi con diminuita sensibilità alle pleuromutiline, venne riscontrato, ovviamente, nel 2002 e, poi, un anno dopo 11 allevamenti. Negli altri anni il numero

di allevamenti si è ridotto a 5 o 6. In totale abbiamo confermato 48 allevamenti con isolati che presentavano diminuita sensibilità alle pleuromutiline e che 41 di questi erano caratterizzati da una diminuzione della sensibilità sia nei confronti della tiamulina che della valnemulina. Gli allevamenti suini che rispondevano a questi criteri vennero contattati e venne richiesta una cooperazione volontaria. In stretta collaborazione con i colleghi interni dei vari allevamenti distribuimmo un questionario per poter analizzare alcuni fattori associati con lo sviluppo della ridotta sensibilità e/o della antibiotico-resistenza. Le risposte ottenute mostrarono che gli allevamenti stavano utilizzando principalmente (90%) la terapia nell'alimento. Questa analisi dimostrò che l'isolamento di ceppi di *B. hyodysenteriae* meno sensibili alle pleuromutiline erano limitati ad aziende con SD endemica dove gli antibiotici non venivano alternati in modo sistematico ogni 3-4 anni e, allo stesso tempo, venivano somministrate dosi non adeguate di farmaco a causa della scarsa miscelazione del principio attivo nell'alimento. Con nostra sorpresa in questi allevamenti venivano usate molto spesso tiamuline generiche per la medicazione dell'alimento, a causa del minor prezzo. Ceppi a ridotta sensibilità si diffondevano sul territorio attraverso la vendita di suinetti da questi allevamenti ttraversoa spedizioni o relazioni commerciali non regolate. L'aumento di ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati con minor sensibilità alle pleuromutiline dovrebbe allarmare gli allevatori e spingerli ad avere un approccio più responsabile per prevenire l'ulteriore diffusione della SD.

Il ruolo dei nucleus herds (NH) nell'epidemiologia della SD

Tra le fonti della SD in Repubblica Ceca, non possiamo escludere i *NH* appartenenti a gruppi di allevamento internazionali. Durante gli ultimi tre anni abbiamo osservato due focolai di SD in *NH* gestiti da compagnie internazionali di allevamento e nelle quali lavorava personale ceco. Il primo focolaio particolarmente interessante venne osservato casualmente, per la presenza di diarrea in scrofette dopo spedizione all'acquirente. Il sospetto clinico di SD (solo una lieve diarrea non emorragica) venne confermato dall'isolamento di *B. hyodysenteriae*, che venne caratterizzata come ceppo a bassa virulenza nell'infezione sperimentale che venne condotta in seguito. Un'analisi ulteriore rivelò che le scrofe e le scrofette del *NH* erano spesso escretrici di questo ceppo a bassa virulenza senza alcuna alterazione nella consistenza delle feci né alcun sintomo clinico di SD. La compagnia di allevamento decise comunque di eradicare la SD nel *NH* mediante depopolamento.

Il secondo focolaio in un *NH* (un'altra compagnia di allevamento estera) era associato ad un ceppo virulento, causa di una SD in forma acuta. La nostra indagine epidemiologica dimostrò che quell'infezione era stata diffusa dalle scrofette provenienti dal *NH* agli allevamenti moltiplicatori e poi anche ai successivi clienti cechi. I sintomi clinici tipici di SD vennero riconosciuti dal veterinario immediatamente durante la consegna all'allevamento acquirente. Dato che la compagnia d'allevamento non procedere al ritiro degli animali, questi vennero mandati al macello su decisione dell'acquirente. La SD venne confermata nel nostro laboratorio nonostante la compagnia di allevamento stesse cercando di nascondere informazioni concernenti il focolaio. Poiché il tentativo di eradicare la malattia in uno stretto periodo di tempo con la tiamulina non ebbe suc-

cesso, il proprietario decise di vendere l'allevamento primario e i moltiplicatori ad una compagnia ceca, che non è stata in grado di eradicare la SD fino ad ora. La compagnia internazionale trasferì l'attività in un altro allevamento, che era stato chiuso e depopolato a causa della SD due anni prima. L'allevamento primario divenne positivo per SD introducendo scrofette provenienti dal NH ceco con *B. hyodysenteriae* con minor sensibilità alle pleuromutiline. Anche il ruolo degli allevamenti primari cechi nel diffondere la SD è stato sostanziale. Nel corso del periodo (2002-2003) durante il quale si ebbe un aumento della prevalenza, circa 6 dei 60 *NH* ancora esistenti erano diventati positivi per SD. Invece di eradicare essi iniziarono a controllare la SD con il trattamento senza alcuna restrizione nella produzione di scrofette. In poco tempo anche gli allevamenti moltiplicatori fornivano scrofette infette. Così allevamenti che cooperavano tra loro vennero infettati dagli altri secondo la piramide di allevamento (dai *NH* agli acquirenti finali), senza nessuna possibilità di eradicazione a causa delle cooperazioni economiche. Tutte gli allevamenti primari (NH) con episodi precedenti di SD non furono in grado di eradicare l'infezione. Due anni fa è stato introdotto un programma di monitoraggio volontario (il programma includeva quattro malattie) per gli allevamenti primari. Su 50 allevamenti primari (NH) solo uno è stato identificato come positivo per SD, invece dei cinque che avevano precedenti di SD.

Scelta dei farmaci per il trattamento, come punto chiave

Nei dieci anni passati, la scelta di antidissenterici per via parenterale o orale disponibili nei paesi europei si è notevolmente ristretta. Inoltre, dai dati ottenuti in campo, si evince che, in Repubblica Ceca, la resistenza dell'agente causale di SD esclude l'uso non solo della tilosina ma anche della lincomicina, per somministrazione sia parenterale sia orale.

Il nostro primo risultato, concernente i valori di MIC della tilosina per gli isolati di *B. hyodysenteriae* in Repubblica Ceca, ha mostrato una diffusione di resistenza, nonostante la tilosina non venisse utilizzata per il trattamento della SD in quel periodo. Il principale obiettivo del suo utilizzo intensivo nell'alimento era la terapia per la polmonite enzootica (dagli anni 90) e più tardi per l'ileite (1998). Con l'aumento della prevalenza della SD, la terapia con tilosina divenne pericolosa poiché selezionava ceppi resistenti di *B. hyodysenteriae*. Così dal 1999 proponemmo di non utilizzare più la tilosina in tutti quegli allevamenti con SD o a rischio di infezione. Contemporaneamente un suo derivato, l'acetylisovaleryltilosina (AIVT), venne registrato nel 2002 in Repubblica Ceca per il trattamento della SD. La distribuzione dei valori di MIC della AIVT, che sono stati registrati (3.125 a 100 mg/l) per gli isolati di *B. hyodysenteriae* durante i focolai di SD tra il 1996 e il 2001, è caratterizzata da una curva unimodale con il picco a 25,0 mg/l. Contrariamente, è stata rilevata resistenza alla tilosina in tutti questi isolati. Da questi risultati si evinse che la resistenza degli isolati per la tilosina non corrispondeva ad una resistenza anche per AIVT. Così la AIVT fu raccomandata dal 2002 in Repubblica Ceca per la terapia della SD, come scelta alternativa alle pleuromutiline, nel caso in cui queste non fossero clinicamente efficaci. L'uso incontrollato di AIVT

anche in alcuni allevamenti, nei quali le pleuromutiline venivano considerate troppo costose per la terapia, ha portato all'aumento dei valori di MIC a più di 100 mg/l. Durante il periodo successivo 2003-2006 vennero riportati alcuni casi di mancata efficacia clinica durante la terapia con AIVT, parzialmente associata ad una insufficiente capacità di ingestione dei suini sintomatici. Maggiori valori di MIC per AIVT portarono ad aumentare i dosaggi per la terapia, in alcuni casi con effetti positivi sul quadro clinico. Durante gli ultimi due anni sono state registrate MIC veramente alte rispetto a quando venne introdotta la AIVT. Oggi i valori di MIC della AIVT non vengono valutate routinariamente, tranne quando gli isolati mostrano una diminuita sensibilità alle pleuromutiline. A tale proposito rimane comunque un grosso problema da risolvere: la mancanza di dati per potere classificare i ceppi come Sensibili, Intermedi o Resistenti ad AIVT in base ai risultati delle MIC.

Dato che l'alternativa, ad esempio la AIVT, può essere presa in considerazione solo dopo la valutazione della MIC in laboratorio, le opzioni per i trattamenti di prima scelta si restringono alla tiamulina e alla valnemulina. Questo dimostra l'importanza chiave della tiamulina nel trattamento della Dissenteria suina. Vorremmo sottolineare che, in un seguito ad una prima diagnosi di SD, lo stadio iniziale è nelle mani dei veterinari pratici, che dovrebbero trattare i casi acuti singolarmente, somministrando tiamulina alle dosi raccomandate. Per il trattamento seguente del gruppo degli animali già malati o a rischio di malattia, i veterinari possono scegliere una somministrazione orale di pleuromutiline nell'acqua di bevanda (preferibilmente) o nell'alimento. Ogni animale del gruppo che non mangia o non beve deve essere ripetutamente trattato con una somministrazione parenterale di tiamulina. La valnemulina per via orale, è un'alternativa solo se i suoi valori di MIC sono minori di quelli della tiamulina. Da quanto detto sopra, segue che nel trattamento della Dissenteria suina causata da ceppi di *B. hyodysenteriae* con valori di MIC sopra certi limiti (intermedi e resistenti), un veterinario responsabile non possa scegliere il farmaco senza i risultati di un laboratorio specializzato, che possono influenzare significativamente la scelta del farmaco per il trattamento. Inoltre le dosi terapeutiche delle pleuromutiline per gli allevamenti, dovrebbero anche variare più prontamente in relazione agli aumentati valori di MIC accertati *in vitro*.

Gli effetti sinergici delle pleuromutiline o della AITV e delle tetraciclina o della doxiciclina sono stati considerati come un approccio alternativo nella pratica terapeutica giornaliera, ovunque venisse individuato un aumento della MIC delle pleuromutiline. Questo approccio, comunque, rischia di aumentare la pressione selettiva delle tetracicline sugli altri batteri, causa di infezioni nel suino.

Quindi l'uso delle tetracicline dovrebbe esser subordinato al monitoraggio della MIC in ogni isolato. I valori di MIC della doxiciclina accertati mediante il metodo della diluizione in agar, mostra che 36 (73%) su 49 dei nostri isolati sono stati classificati come sensibili, 13 (27%) come intermedi e nessuno come resistente. Fino ad ora non abbiamo trovato resistenze alla doxiciclina, ma la percentuale di sensibilità intermedie, secondo l'nterpretazione NCCLS, è in aumento. L'aumento del numero di isolati di *B. hyodysenteriae* con una diminuita sensibilità alle pleuromutiline dovrebbe allertare gli allevatori di suini sulla necessità di un approccio più responsabile alla scelta e all'uso degli antibiotici per le terapie. La nostra esperienza dimostra che è corretto monitorare

le MIC di *B. hyodysenteriae* nei singoli allevamenti nel tempo e sottolinea la necessità della valutazione di laboratorio dell'efficacia degli antibiotici. Solo un approccio prudente alla somministrazione di antibiotici potrà garantire un'efficacia continuativa degli antibiotici d'elezione per un futuro programma di eradicazione per la SD.

Conclusione
Lo scopo del trattamento dovrebbe sempre essere l'eliminazione di *B. hyodysenteriae* dagli allevamenti infetti e sono disponibili solo pochi farmaci (uno o due) per trattare ed eliminare la Dissenteria suina.

Alternative agli antibiotici

Nonostante siano disponibili diversi antibiotici efficaci contro *B. hyodysenteriae*, gli allevatori, in base a considerazioni economiche, scelgono talora altre alternative e l'approccio apparentemente meno dispendioso di controllo della SD mediante additivi.

Estratti vegetali
Due anni fa abbiamo organizzato uno studio con l'obiettivo di valutare gli effetti dell'additivo alimentare Citrex, un prodotto ultra-biotico basato su un complesso di acidi organici (ascorbico, citrico e lattico), sul progresso clinico della SD in una prova di campo. Un gruppo sperimentale di 20 magroni è stato trattato con Citrex nell'acqua di bevanda, mentre il gruppo di controllo (20 suini) non è stato sottoposto ad alcun trattamento. Dopo 24 giorni non c'erano differenze significative nello stato di salute o negli score fecali dei due gruppi. Nel gruppo sottoposto a sperimentazione ammalarono di SD meno animali (60%) in confronto al gruppo di controllo (75%). Sorprendentemente 3 (15%) dei 20 suini trattati con Citrex non erano infetti da SD e non erano escretori di *B. hyodysenteriae* a livelli rilevabili. In contrasto con il gruppo di controllo, dove tutti i suini erano stati infettati e continuavano ad essere escretori durante i 24 giorni. Al momento non sono disponibili dati sperimentali sufficienti riguardo l'efficacia di vari estratti vegetali *in vivo*. L'uso del Citrex ha portato ad una minor incidenza di SD nei suini trattati, tra i quali circa il 15% degli animali era protetto contro l'infezione. Comunque, il Citrex non consegue una completa eliminazione di *B. hyodysenteriae* dal grosso intestino, quando i suini si infettano prima o dopo il trattamento in acqua di bevanda. Quindi possiamo concludere che il Citrex non è un'alternativa al trattamento della SD, quando una buona parte dell'intestino è danneggiata e *B. hyodysenteriae* è presente in notevole quantità, ad esempio durante una forma acuta di SD. Basandoci sulle esperienze ottenute dalla pratica, l'utilizzo del Citrex sembrerebbe più adeguato per un programma di prevenzione, quale strumento per limiare la trasmissione fecoorale di *B. hyodysenteriae*. Nello stesso allevamento con Dissenteria suina endemica, abbiamo osservato che il trattamento long-term con Citrex era in grado di stabilizzare il quadro clinico in tutte le unità di magronaggio e ingrasso. Comunque l'interruzione del trattamento in acqua portò a nuovi casi di SD in alcuni suini del gruppo scelto, dopo 28-30 giorni. É quindi evidente che la forma subclinica della SD persiste e proba-

bilmente i suini con questa forma eliminano il microrganismo con le feci, dato che questo periodo di tempo corrisponde al periodo di incubazione. In questo modo è stato di nuovo confermato che, nella pratica ordinaria, non ci sono possibilità di prevenire l'infezione nei suinetti non protetti, quando sono presenti elevate quantità di *B. hyodysenteriae* nelle feci.

Additivi con Zinco

Durante il periodo di maggior crisi da SD, i nostri allevatori iniziarono ad utilizzare altri additivi alimentari come ZnO e/o Zinco chelato, per il trattamento in acqua di bevanda. É risaputo che lo Zinco gioca un ruolo importante nel metabolismo dei batteri appartenenti a diverse specie così come nei batteri anaerobi. Oltre a questo, la prevalenza di diarrea post-svezzamento e di mortalità causata da *E. Coli* enteropatogeni è notevolmente diminuita nei suinetti alimentati con 2500 - 3000 ppm di ZnO. Il primo studio focalizzato sulla *B. hyodysenteriae* venne pubblicato da Duhamel (1974) in USA molto tempo fa. Egli descrisse il meccanismo mediante il quale l'ossido di Zinco uccide le cellule di *B. hyodysenteriae* in vitro, così come l'effetto in un modello sperimentale di topo. In seguito si scoprì che l'esposizione di *B. hyodysenteriae* a 0.1 mM (16.1mg/l) di $ZnSO_4$ inibisce completamente la produzione di emolisina, che è probabilmente il principale fattore di virulenza coinvolto nella patogenesi della SD. Oggi l'uso di additivi come l'ossido di Zinco o i chelati di aminoacidi-metalli (con Zn e Cu) nell'acqua di bevanda è molto diffuso negli allevamenti con problemi di Dissenteria in Repubblica Ceca. Per confrontare l'effetto dello Zinco chelato rispetto alla valnemulina, è stata portata avanti la seguente sperimentazione.

In seguito all'infezione challenge dei suini con il ceppo B204, ogni giorno veniva effettuata la valutazione dello stato clinico e il prelivo di tamponi rettali per la valutazione dell'eliminazione di *B. hyodysenteriae spp*. Quando raggiunsero l'apice i segni clinici tipici di SD e l'escrezione di *B. hyodysenteriae*, i suini vennero divisi in quattro gruppi e si cominciò il trattamento. Il primo gruppo venne trattato con Zinco chelato (250 ml/1000 l di acqua), al secondo gruppo fu somministrata valnemulina nell'alimento (75 ppm) e al terzo gruppo una combinazione di chelato di Zinco (250 ml /1000 l di acqua) e valnemulina nell'alimento (75 ppm), il quarto gruppo era il controllo. I livelli di escrezione di *B. hyodysenteriae* dai suini nutriti con alimento addizionato con valnemulina (secondo e terzo gruppo) erano minori di quelli dei suini trattati con Zinco chelato (primo gruppo) e del gruppo di controllo. Il secondo giorno dopo l'inizio del trattamento con la valnemulina (secondo gruppo) o con la combinazione Zinco chelato - valnemulina (terzo gruppo), non venne rilevata escrezione di *B. hyodysenteriae.* Al contrario, i suini del primo e del quarto gruppo eliminavano in modo continuativo *B. hyodysenteriae*. La supplementazione di Zinco all'acqua di bevanda diminuì solamente il tasso di isolamento di *B. hyodysenteriae*, quindi *B. hyodysenteriae* non era stata completamente eliminata dall'ospite nè dall'ambiente dell' allevamento e dell'azienda. Le differenze nella consistenza di muco nel colon tra il gruppo di controllo ed il secondo e il terzo gruppo erano significative (rispettivamente $P = 0.05$; $P = 0.01$). L'effetto terapeutico dello Zinco chelato sulla SD sperimentale non è stato provato, ma lo Zinco chelato induce una protezione parziale contro lo sviluppo di lesioni cecali nel suino.

Conclusioni
Questi additivi non sono in grado di trattare la SD ed eliminare *B. hyodysenteriae* con la stessa efficacia degli antibiotici. Secondo i risultati ottenuti dalla nostra sperimentazione e dalle esperienza di campo, l'effetto principale è di tipo profilattico. Sostanze alternative similmente ad alcuni promotori della crescita, possono proteggere l'allevamento da gravi perdite causate dalla SD. Nonostante questo, l'uso di sostanze alternative potrebbe mascherare la malattia in un allevamento infetto. C'è comunque la possibilità di combinare l'uso di antibiotici e di sostanze alternative se non c'è la possibilità di eliminare la SD dall'allevamento in breve tempo.

Eradicazione

L'eradicazione della Dissenteria suina si dovrebbe basare sull'eliminazione di *B. hyodysenteriae* dal tratto intestinale dei suini, mediante terapia antibiotica, e dall'ambiente mediante disinfezione. Al momento dell'eradicazione è necessario assicurare un sistema efficacie di barriere contro la trasmissione di *B. hyodysenteriae* nella parte pulita dell'allevamento. È molto importante prevedere un sistema di monitoraggio efficace per rilevare eventuali recidive. È basilare per l'efficacia dell'eradicazione somministrare agli animali un ottimo alimento e prevedere modifiche gestionali e strutturali dell'allevamento. È comunque essenziale creare un team di esperti e tecnici, che siano in grado di seguire il programma di eradicazione così come di portare a termine tutti gli obiettivi preposti. É necessario informare e formare tutti quelli che verranno coinvolti nel processo di eradicazione riguardo tutti gli step che devono essere realizzati. È molto importante anche calcolare il budget e mettere da parte le risorse finanziarie per l'intera durata dell'eradicazione.

Eliminazione di B. hyodysenteriae con MIC di 2-4 mg/l alla tiamulina
Il problema dell'eliminazione di *B. hyodysenteriae* dai portatori si pone ogni volta che la MIC della tiamulina si avvicina a 4 mg/l.
La tiamulina è il farmaco di scelta per la terapia, ma l'aumento delle MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* porta ad un aumento dei dosaggi del massimo possibile, sia nella somministrazione nell'acqua di bevanda sia nell'alimento e allo stesso tempo per la somministrazione parenterale. Secondo la nostra esperienza, esiste il rischio di sviluppare MIC negative nei confronti di entrambe le pleuromutiline, in particolare quando nell'allevamento la valnemulina è stata precedentemente usata in modo alternato alla tiamulina per via orale. A dire il vero, un'eradicazione efficacie della SD in un allevamento con MIC maggiori per la tiamulina (2-4 mg/l) è avvenuta solo due volte dal 2000. La prima volta fu in un allevamento dove gli isolati dagli ingrassi con diarrea mostravano MIC di 2,0-4,0 mg/l, mentre gli isolati dalle scrofe (450), asintomatiche, avevano una MIC di 0,15 mg/l nei confronti della tiamulina. La decisione decisiva fu la seguente: trattare le scrofe con la tiamulina per via parenterale e, per la somministrazione nell'alimento, con una combinazione di tiamulina e tetracicline. Tutti i suini in ingrasso vennero spostati dall'allevamento a la produzione venne interrotta per tre

mesi. I suinetti sottoscrofa vennero trattati due volte con un'iniezione di tiamulina e, poi, trattati (tiamulina con tetracicline) dopo lo svezzamento e nelle fasi di accrescimento e ingrasso. Il programma di terapia venne portato avanti per 5 mesi. Non ci furono recidive durante l'eradicazione e l'allevamento è indenne da SD da 7 anni.

Eliminazione di B. hyodysenteriae con MIC per le pleuromutiline di 8-16 mg/l
Negli allevamenti con isolati che mostravano una diminuzione della sensibilità ad entrambe le pleuromutiline, la nostra attenzione si è concentrata soprattutto sulla risoluzione di questo problema. Inizialmente è stata analizzata la situazione, ed in seguito è stato messo a punto un trattamento specifico per l'allevamento con particolare riguardo alla scelta di antibiotici ottimali o combinazioni di questi, alla loro somministrazione, alle dosi e alla durata del trattamento. Nei casi in cui la MIC per la tiamulina non era più alta di 8 mg/l, abbiamo proposto di trattare gli animali con una combinazione di tiamulina/tetraciclina e/o tiamulina/doxiciclina. Il trattamento era però, per questo motivo, particolarmente costoso per l'allevatore in un periodo di pochi mesi. Quindi quando la MIC per la AIVT non era aumentata abbiamo proposto l'utilizzo di questo farmaco, anche ad alti dosaggi per eliminare *B. hyodysenteriae.*

Eliminazione di B. hyodysenteriae con MIC per le pleuromutiline superiore a 16 mg/l
Negli allevamenti con SD dove le MIC per le pleuromutiline sono molto alte, un programma basato sul loro utilizzo non sembra avere reali possibilità di successo. Inoltre quando vengono analizzati in vitro tutti gli antibiotici registrati come antidissenterici (pleuomutiline, lincomicina, AIVT) e questi mostrano alte MIC, è necessario fare vuoto sanitario seguito da ripopolamento. Ci sono stati diversi allevamenti in Repubblica Ceca dove la resistenza degli isolati alle pleuromutiline ha costretto a scegliere il depopolamento come soluzione per eradicare la malattia.

Disinfezione e disinfettanti
La valutazione dell'efficacia dei disinfettanti contro *B. hyodysenteriae* ha sempre suscitato poco interesse. La miglior efficacia disinfettante è stata dimostrata per i Sali di ammonio quaternario e il per il gruppo degli acido tar-organici.

Monitoraggio delle ricadute
Il programma di eradicazione della Dissenteria suina basata sul totale vuoto sanitario e sul seguente ripopolamento con suini provenienti da allevamenti SD-free, richiede un controllo di questi suini con test di laboratorio appropriati. Il grado di sensibilità di molti dei metodi diagnostici diretti usati oggi, non permette di capire che un singolo animale è portatore di *B. hyodysenteriae*. Questi metodi non sono in grado di identificare in modo affidabile la SD a livello di allevamento, in particolare quando gli animali non presentano alcun sintomo di diarrea. I metodi diretti falliscono anche quando i suini sono stati trattati con preparazioni antibiotiche somministrate nel cibo o nell'acqua di bevanda. Nel caso di isolati con buona sensibilità, è necessario il prelievo di campioni di feci di gruppi o categorie di età sensibile durante il periodo in cui non si effettua terapia. Solo nel corso di recidive di SD dovute a isolati di *B. hyodysenteriae*

con MIC superiori a 16 mg/l, ci possiamo aspettare una buona affidabilità utilizzando l'esame colturale durante il trattamento.

Piano di eradicazione
E' fondamentale predisporre un programma specifico per l'allevamento, proposto insieme ad un gruppo di esperti (veterinari specialisti per i suini, microbiologi, epidemiologi, rappresentanti delle compagnie farmaceutiche, esperti di amministrazione e tecnologie dell'allevamento suino e esperti di finanza). Secondo la nostra esperienza la via migliore è quella di combinare esperti esterni (indipendenti dalla situazione) con il veterinario aziendale e l'allevatore. La cosa più importante per l'allevatore è il calcolo dei costi del programma di eradicazione. Abbiamo registrato il notevole aumento dei costi per il trattamento in relazione alle MIC per le pleuromutiline. In confronto a situazioni che vedono MIC degli isolati inferiori a 1, 0 mg/l, il calcolo dei costi per gli allevamenti con MIC 4,0 mg/l erano alla fine una volta maggiori e con MIC di 8-16 mg/l più del doppio. A causa dei costi molto elevati del trattamento per l'eradicazione della SD il programma è stato abbandonato nel 2005 in un grande allevamento con 1200 scrofe e 10000 animali in magronaggio dopo 3 mesi. L'allevamento divenne insolvente e decise di vendere i suini rimanenti.

Prospettive per l'eradicazione della SD
In Repubblica Ceca, rispetto alla Svezia, l'eradicazione della SD su scala nazionale non è al momento un obiettivo realistico nè per le associazioni di allevatori di suini né per le autorità statele. Anche se abbiamo allevatori e colleghi che hanno sperimentato l'eradicazione della SD, organizzata dalle autorità statale fino al 1994, attualmente l'industria suinicolo soffre di grandi problemi economici. Dal 1996 abbiamo registrato solo pochi tentativi (8-10) di eradicazione della SD.

Conclusioni
Il trattamento della SD diventa difficile in alcuni allevamenti così come il controllo della stessa a causa di una minor sensibilità di *B. hyodysenteriae* agli antibiotici d'elezione. Quindi il monitoraggio dello sviluppo di resistenze antibiotiche è di fondamentale importanza. I risultati ottenuti con l'utilizzo di sostanze non antibiotiche, hanno mostrato solo effetti moderati sull'andamento clinico della SD. Il ruolo principale di queste sostanze sembra essere nella prevenzione delle manifestazioni cliniche e delle perdite economiche causate dalla SD. Per fare in modo che la produzione suina rimanga efficiente sono possibili due alternative: la prima, seguire l'esperienza svedese e la seconda sviluppare nuove vie di trattamento e prevenzione della SD. Fino ad ora non sono disponibili in commercio vaccini efficaci. Nuove scoperte riguardanti l'immunologia hanno suggerito nuove direzioni di ricerca. Lo sviluppo di vaccini continuerà sicuramente visto che i successi nella prevenzione, nel controllo e nell'eradicazione della Dissenteria suina non possono essere ottenuti senza la vaccinazione nell'avversa situazione economica attuale.

Principali problemi legati alla SD

La patogenesi molecolare della SD rimane poco chiara. Non conosciamo quale sia la chiave per l'inizio e lo sviluppo dell'infezione. I meccanismi che inducono l'aumento dei valori di MIC di *B. hyodysenteriae* alle pleuromutiline sono completamente sconosciuti. La necessità di un vaccino come punto di inizio per la prevenzione della SD, cresce con il diffondersi della multiresistenza agli antibiotici dell'agente eziologico della SD. A causa del numero limitato di agenti antimicrobici efficaci attualmente disponibili, il potenziale per l'emergenza di ceppi multiresistenti di *B. hyodysenteriae* diventa una preoccupazione internazionale.

LA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE IN SEGUITO ALL'EMERGENZA 2006-2007

MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: SITUAZIONE NAZIONALE DELLA MALATTIA E PROSPETTIVE PER LE NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO

SWINE VESICULAR DISEASE IN ITALY: EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND FUTURE CONTROL STRATEGIES

SILVIA BELLINI
Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari (CERVES)
Istiuto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
Via Bianchi 9, 25124 Brescia

Parole chiave: Malattia Vescicolare del Suino, Suino, attività di sorveglianza, Eradicazione, Strategie di controllo.
Key words: Swine Vesicular Disease, Swine, Surveillance Activities, Eradication, Control Strategies.

Riassunto. L'Italia è considerata endemica per la malattia vescicolare del suino (MVS) e per questo motivo sono in corso piani di eradicazione. Nel periodo 2006 – 2007 c'è stata una recrudescenza della malattia, il picco epidemico è stato negli ultimi mesi dell'anno, quando la malattia è stata individuata ed è diffusa nelle regioni settentrionali. La Lombardia è risultata la regione maggiormente interessata. La presenza della MVS in regioni del Nord, dove è presente una realtà zootecnica di tipo intensivo, ha provocato gravi danni economici nell'intera filiera suinicola. Le attività di sorveglianza nei confronti della MVS continuano ad essere mantenute per giungere all'eradicazione della malattia, ma anche per dimostrare che c'è una parte del territorio nazionale che è "libero da infezione" e poter così garantire l'esportazione dei prodotti. La presenza di una malattia come la MVS in un territorio comporta gravi restrizioni commerciali sull'esportazione di animali vivi e di prodotti derivati e le conseguenti ripercussioni economiche che questo comporta. Quanto accaduto nel corso del 2006 rende indispensabile una revisione delle misure di controllo per la malattia, che, oltre a quanto già previsto nei precedenti piani dovrà tenere contro delle criticità riscontrate nella recente epidemia e proporre gli opportuni correttivi.

Abstract. SVD has been persistently reported in Italy in the last decade, hence surveillance and eradication activities are in place. During 2006 - 2007 a recrudescence of SVD was reported in Italy and outbreaks were identified in Northern regions, Lombardia resulted the one mainly affected. The presence of the disease in Northern Regions caused heavy economic losses in swine farming and meat processing industry.
Surveillance and eradication activities for SVD have to be maintained in Italy to reach the disease free status for the whole Country. Anyhow, surveillance activities are also essential for trade purpose, in fact they are necessary to demonstrate that part of Country is already SVD-free. The presence of a disease, such as SVD, impairs the export of live animals and by-products abroad.

The critical factors highlighted during the 2006 – 2007 epidemic have been taken into account to review the surveillance actions foreseen in the national surveillance and eradication plan.

INTRODUZIONE

La Malattia Vescicolare del Suino (MVS) è stata identificata per la prima volta in Italia nel 1966. L'agente eziologico è un virus della famiglia dei Picornaviridae, genere Enterovirus (1). Le lesioni nel suino sono simili a quelle dell'afta epizootica e questo è il principale motivo per cui questa malattia a decorso benigno era stata inserita nella lista A dell'O.I.E. Dal 1973 in Italia la MVS è inserita nell'elenco delle malattie soggette a notifica obbligatoria (O.M. del 13 febbraio 1973).
Ad eccezione dell'Italia, la MVS è stata eradicata in Europa all'inizio degli anni 80, anche se dal 1992 si sono verificati focolai in Olanda, Spagna, Portogallo e sono state evidenziate positività sierologiche in Belgio. Nel 2007 sono stati segnalati 89 focolai in Italia, che è considerata endemica per MVS, e un focolaio in Portogallo.
In Italia dal 1995 è in corso un Piano di sorveglianza che ha l'obiettivo dell'eradicazione da raggiungere attraverso l'accreditamento delle aziende e delle regioni. Le regioni del centro nord hanno raggiunto l'accreditamento a partire dal 1997, alcune regioni dell'Italia meridionale non lo hanno mai raggiunto (Figura 1).

Fig. 1. Regioni accreditate e non accreditate per MVS
Fig. 1. *Italy by regions qualified and non-qualified for SVD*

Nel periodo 2006-2007 in Italia c'è stata una recrudescenza della malattia, il picco epidemico è stato alla fine del 2006, quando la malattia è stata individuata ed è diffusa in Italia settentrionale. Nel corso del 2007 situazioni epidemiologiche di rischio sono state evidenziate sia in Italia centrale che settentrionale, la regione maggiormente interessata è stata la Lombardia, dove, nel periodo 2006 – 2007 sono stati individuati 53 focolai e sono stati abbattuti circa 150.000 capi (Figura 2).

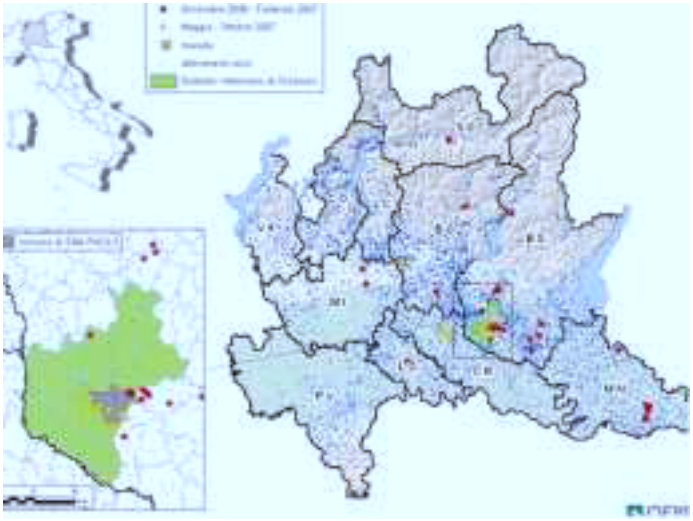


Fig. 2. MVS in Lombardia 2006 - 2207.
Fig. 2. *SVD in Lombardia in the period 2007 – 2007.*

La presenza della MVS in una realtà zootecnica di tipo intensivo, ha provocato gravi danni economici all'intera filiera suinicola. Le criticità riscontrate nelle recenti epidemie hanno reso necessario rivedere le misure di controllo previste per la malattia.

MATERIALI E METODI

Di seguito viene riportato l'elenco dei principali provvedimenti legislativi che regolano le attività di controllo e di eradicazione della MVS:
- Direttiva del Consiglio 92/119/EEC (DPR 362/96): definisce le misure generali di lotta nei confronti della malattia vescicolare del suino e regolamenta le attività di eradicazione in caso di focolaio.
- Decisione della Commissione 2000/428/CE: procedure diagnostiche, metodi di campionamento e criteri per la valutazione dei risultati dei test di laboratorio per la conferma e la diagnosi differenziale della MVS.
- Ordinanza Ministeriale 26 Luglio 2001, Piano nazionale di eradicazione e sorveglianza della Malattia Vescicolare e sorveglianza della Peste Suina Classica.

- Decisione della Commissione 2005/779/CE: relativa a misure sanitarie di protezione per la MVS in Italia. In allegato viene riportata la lista delle regioni riconosciute indenni/non indenni da MVS, viene introdotto il principio della regionalizzazione.
- Decisione della Commissione 2007/9/CE: emenda la 2005/779/CE. Con questo emendamento vengono meglio definite le modalità di sorveglianza per la malattia e i criteri per lo spostamento in deroga degli animali dalle regioni non accreditate.
- Decisione della Commissione: che emenda la 2005/779/CE. Con questo emendamento viene introdotto la provincia come unità territoriale di riferimento, oltre la regione, che era già stata introdotta con la 2005/779/CE. Il presente documento non è stato ancora pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale, è stato votato all'unanimità in ambito di Comitato Veterinario Permanente del mese di gennaio, è in corso di registrazione.

RISULTATI

Situazione epidemiologica
Nel corso del 2007 sono stati registrati in Italia 89 focolai di MVS, nelle aziende interessate erano presenti 70.089 capi. Di questi: 32 sono stati individuati nelle regioni non accreditate (35,9%) e 57 (64%) in quelle accreditate. Le regioni interessate: Lombardia (23), Marche (1), Lazio (23), Abruzzo (6), Molise (11), Campania (8), Calabria (18).
Al di là della segnalazione di focolai in regioni non accreditate, la malattia è stata individuata ed è diffusa nelle regioni accreditate. In Italia centrale (Abruzzo, Lazio e Marche) e in Lombardia ci sono state situazioni epidemiologiche di rischio che a livello nazionale e internazionale hanno destato notevole preoccupazione per la modalità di diffusione dell'infezione.

MVS in Italia Centrale
Nei mesi di febbraio e di marzo sono stati riportati 2 focolai primari in stalle di sosta della provincia di Frosinone, in contemporanea, nel mese di marzo, è stato individuato un focolaio in una stalla di sosta della provincia delL'Aquila. Quest'ultima azienda, nonostante la "regionalizzazione" vigente per l'Abruzzo per la MVS, manteneva un suo circuito commerciale di suini (illecito) con la provincia confinante di Frosinone. La ricostruzione degli scambi di animali ed i conseguenti controlli diagnostici, hanno consentito di individuare focolai di MVS in Abruzzo (5, oltre a quello della stalla di sosta), Lazio (21) e Marche (1).
Nel circuito erano principalmente coinvolte stalle di sosta e allevamenti da ingrasso, spesso di piccole dimensione, che in alcuni casi svolgevano un'attività commerciale, anche di animali da vita.
Sulla vicenda sono stati aperti procedimenti della Procura della Repubblica e indagini dei NAS. Alla Regione Lazio è stato sospeso l'accreditamento per MVS.

MVS in Lombardia
Nel corso del 2007 in Lombardia sono stati individuati 23 focolai, raggruppabili in 2 periodi epidemici che sono separati da un silenzio epizotologico di circa 3 mesi. I

focolai del primo periodo erano in realtà la coda dell'epidemia che aveva coinvolto l'Italia settentrionale e aveva registrato il suo picco alla fine del 2006. In questo primo periodo del 2007 sono stati individuati 6 focolai e le province interessate quelle di Mantova, Brescia e Milano, l'ultimo focolaio di questo primo periodo è stato estinto a febbraio 2007. L'epidemia sembrava controllata e la malattia estinta, quando invece, dopo un silenzio epidemiologico di circa 4 mesi, la malattia è ricomparsa a maggio, in un'azienda di Cremona, provincia che non era stata coinvolta nella precedente epidemia. Nel secondo periodo epidemico del 2007 sono stati individuati 17 focolai: le province interessate quelle di Cremona, Bergamo e Brescia.
Ad eccezione del focolaio di Bergamo, che è stato individuato al mattatoio, i focolai MVS del secondo periodo epidemico si sono verificati in una zona ben delimitata a cavallo tra le provincia di Brescia e quella di Cremona (figura 2). I Comuni interessati della provincia di Brescia, sono da considerarsi ad elevata densità suinicola e sono stati coinvolti in entrambi i periodi, nel secondo, in una zona ristretta di questi Comuni, sono state evidenziate gravi difficoltà nell'eradicazione dell'infezione; la malattia infatti diffondeva senza evidenza di correlazione diretta fra focolai. Per scongiurare l'ulteriore diffusione dell'infezione dall'area a rischio, si è dovuti ricorrere al depopolamento delle aziende.
Dai risultati delle attività di sorveglianza in Lombardia, emerge che i due periodi epidemici non possono considerarsi completamente disgiunti. La presenza di aziende sieropositive nella provincia di Lecco, Brescia, Cremona e Bergamo sembra supportare l'ipotesi che siano rimaste sul territorio lombardo sacche residue d'infezione del primo periodo epidemico. Questa ipotesi sembra in parte avvalorata anche dalle informazioni emerse attraverso il confronto delle sequenze nucleotidiche dei virus MVS isolati.
Alla provincia di Brescia è stato revocato l'accreditamento per MVS.

Fattori di critici individuati
I fattori critici che sono stati individuati nella gestione delle attività di sorveglianza ed eradicazione della malattia sono abbastanza differenziati a seconda del contesto zootecnico cui ci si riferisce, per motivi di semplicità di trattazione nel presente lavoro vengono presentati indifferenziati.
- anagrafe suina incompleta e una scarsa registrazione e documentazione degli spostamenti animali. La non corretta registrazione e documentazione dello spostamento degli animali rende difficoltose le attività di rintraccio e quindi le attività di contenimento ed eradicazione delle malattie.
- scarsa rispondenza tra l'indirizzo produttivo delle aziende e la reale attività svolta dalle stesse. I controlli previsti per le aziende dal Piano, sono commisurati al potenziale di rischio che queste possono avere nella introduzione/diffusione dell'infezione e, considerate le caratteristiche epidemiologiche della malattia, questo è fortemente condizionato dall'attività produttiva delle stesse.
- In alcuni casi, specie nelle aziende di grandi dimensioni e con particolari caratteristiche gestionali (aziende da ingrasso), le modalità di campionamento si sono rivelate insufficienti per evidenziare la presenza della malattia, specie quando l'infezione era di recente introduzione.
- Forti carenze nell'applicazione delle misure di biosicurezza, e questo, specie nella

realtà zootecnica di tipo intensivo, è uno degli elementi che ha contribuito a rendere estremamente vulnerabile il sistema, facilitando la diffusione dell'infezione.
Le criticità evidenziate nel presente paragrafo se agiscono in combinazione e si verificano in una realtà zootecnica intensiva, esercitano un effetto volano nella diffusione dell'infezione.

Sviluppi della legislazione di riferimento
Al momento attuale non sono previsti sostanziali cambiamenti nelle misure che regolamentano le attività in caso di focolaio di malattia. I provvedimenti contemplati sono piuttosto severi anche perché la MVS è tra le malattie dell'allegato C della Direttiva Consiglio 90/425 del 26 giugno 1990, direttiva che regola gli scambi comunitari. In caso di focolaio di una di queste malattie sono obbligatoriamente previste azioni di emergenza, tra queste anche le restrizioni sul territorio (Paese, Regioni o Zone).
Il concetto di regionalizzazione per la MVS è stato introdotto con la Decisione della Commissione 2005/779/CE, integrata poi con la 2007/9/CE. Stante la situazione storica della MVS in Italia, tale provvedimento, emanato all'inizio del 2006, aveva lo scopo di facilitare gli scambi commerciali di animali vivi e di prodotti derivati con i Paesi Terzi. In allegato infatti sono elencate le regioni da considerare indenni o non indenni per la MVS, questo sottintende che i provvedimenti restrittivi sono da applicare alle regioni non indenni, in quanto la restante parte del territorio nazionale è da considerarsi "libero da infezione".
La situazione epidemiologica della MVS in alcune delle regioni accreditate è precipitata tra la fine del 2006 e il 2007, pregiudicando la possibilità di esportare prodotti dalle regioni accreditate verso i Paesi Terzi. Queste regioni ora si trovano nella condizione di recuperare lo status d'indennità, di dimostrare che lo hanno ri-acquisito e anche di mantenerlo.
Nel mese di gennaio 2008 nell'ambito del Comitato Veterinario Permanente dell'Unione Europea è stato votato un ulteriore emendamento alla 2005/779/CE, attualmente in attesa di registrazione, che prevede la possibilità di definire unità territoriali di restrizione più piccole (provincia).

Prospettive Future
L'Office International des Epizooties (OIE), considerate le difficoltà esistenti nello stabilire e mantenere per un intero territorio nazionale lo "status d'indennità da un'infezione", prevede, ai fini dei commerci internazionali di animali e prodotti derivati, che un Paese possa stabilire e mantenere lo status d'indennità in una sub-popolazione animale nell'ambito del proprio territorio. Questa sub-popolazione può essere separata dalla restante da barriere naturali o geografiche (regionalizzazione o zonizzazione) o, in certe situazioni, da l'applicazione di appropriate pratiche manageriali (compartimentalizzazione).
L'applicazione di specifiche misure di biosicurezza in azienda o in gruppi di aziende, costituisce quindi il presupposto utilizzato dall'OIE per la definizione del "comparto".
Il concetto di compartimentalizzazione è stato introdotto recentemente nel codice zoosanitario come una modalità, alternativa alla regionalizzazione, per gestire malattie e

patogeni in una popolazione, senza necessariamente compromettere le esportazioni. Con la regionalizzazione il diverso stato sanitario di una sub-popolazione animale viene definito sulla base di un confine geografico, nella compartimentalizzazione sono invece le pratiche manageriali e di biosicurezza a fornire la garanzie sanitaria alle aziende che sono parte del comparto.
La compartimentalizzaione è uno strumento concettualmente utilizzabile per tutte le malattie (quasi), è stato però sviluppato per l'Influenza Aviaria anche se non è mai stato applicato. Il suo utilizzo ai fini delle esportazioni e assai prematuro, è infatti ancora necessario un affinamento: 1) delle procedure di implementazione, 2) della cornice legislativa di supporto. E' in ogni caso il Paese Terzo che bilateralmente ha la facoltà di accettarlo o meno per la malattia che è oggetto della trattazione, e questo dipende anche dalle garanzie che vengono offerte.

CONCLUSIONI

Le attività di sorveglianza per la MVS continuano ad essere mantenute sul territorio nazionale per giungere all'eradicazione della malattia in quelle regioni che non l'hanno mai raggiunta, ma anche per dimostrare che una parte del territorio nazionale è "libera da infezione", e questo è indispensabile per l'esportazione dei prodotti.
Le criticità riscontrate nelle recenti epidemie hanno reso necessario la revisione delle attività di sorveglianza e di eradicazione, le misure correttive saranno parte integrante del nuovo Piano MVS, già approvato dalla CE. L'Unione Europea ha richiesto misure più rigide per risolvere le problematiche storiche che condizionano la persistenza della malattia in Italia (anagrafe, stalle di sosta), pena la non approvazione del Piano Nazionale.
La presenza della MVS nel periodo 2006 – 2007 nelle regioni accreditate ha provocato gravi danni economici all'intera filiera suinicola. Ai danni legati direttamente alla presenza della malattia si sono sommati i danni indiretti conseguenti alla mancata esportazione di prodotti derivati. La Lombardia è risultata la regione maggiormente interessata e l'epidemia è stata contraddistinta da una rapida diffusione dell'infezione, sono state infatti registrate notevoli difficoltà nella gestione delle attività di eradicazione dell'infezione. Tutto ciò conferma che quando è necessario ricorrere all'applicazione di misure di eradicazione per una malattia, significa che è fallita l'attività di prevenzione, con le ripercussioni economiche del caso, che sono commisurate al contesto zootecnico cui si riferiscono. Quanto accaduto in Italia settentrionale deve quindi far riflettere sui gravi rischi in cui può incorrere il settore suinicolo, quando, in aree ad elevata densità, viene introdotta una malattia infettiva e diffusiva, al fine di apportare rapidamente gli opportuni correttivi.

BIBLIOGRAFIA

Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G.L., Burrow R., Goodridge D., Brown F. & Cartwright B. (1968). A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an Enterovirus. Nature, 219, 1275-6.

LA MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO IN LOMBARDIA: EPIDEMIE A CONFRONTO DAL 1998 AL 2007

SWINE VESICULAR DISEASE IN LOMBARDY REGION: COMPARISON AMONG THE EPIDEMICS OCCURRED FROM 1998 TO 2007

GIORGIO ZANARDI, LORIS ALBORALI, SILVIA BELLINI, DOMINGA AVISANI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna

Parole chiave: malattia vescicolare del suino, *enterovirus*, epidemia, epidemiologia, fattori di rischio
Key words: swine vesicular disease, *enterovirus*, epidemic, epidemiology, risk factors

Riassunto. Nell'ultima decade in Lombardia si sono verificati quattro episodi di malattia vescicolare del suino (MVS).
La prima epidemia, apparsa alla fine di ottobre 1998 ed eradicata alla fine di febbraio 1999, fu caratterizzata dall'insorgenza di 18 focolai localizzati in 4 province: Cremona (7), Mantova (6), Brescia (3) e Bergamo (2).
Questa epidemia convinse la regione Lombardia a realizzare un Piano straordinario di controllo e d'eradicazione della MVS, ad integrazione di quello nazionale.
La seconda incursione del virus della MVS avvenne nella prima metà del 2000 ed interessò tre stalle di sosta, di cui due in provincia di Mantova e una in provincia di Brescia. Tutti i focolai furono considerati primari.
La terza epidemia accadde nel 2002 in provincia di Bergamo; da due focolai primari si rintracciarono altri 11 focolai secondari, di cui due nelle regioni confinanti di Veneto ed Emilia Romagna. Tutti i focolai secondari si dimostrarono a fondo cieco, non diffondendo la malattia ad altri allevamenti.
L'ultima incursione di MVS è durata un anno, da novembre 2006 ad ottobre 2007, con la notifica di ben 53 focolai e l'abbattimento di 148.464 capi. La provincia maggiormente colpita è stata quella di Brescia con 32 casi e 100.591 capi abbattuti. La portata dell'evento, sia come numero di focolai, ma soprattutto come persistenza nel tempo dell'*enterovirus* sul territorio, ha causato notevoli danni diretti e indiretti, con prolungate limitazioni delle movimentazioni animali in zone ad alta densità suinicola.
D'altro canto, in tutti gli episodi occorsi, la MVS ha confermato i noti meccanismi di trasmissione intra e inter-allevamento.
Oggetto dell'intervento è la comparazione dei parametri che hanno caratterizzato le diverse epidemie, emersi attraverso l'analisi dei dati epidemiologici raccolti, alla luce dei cambiamenti intercorsi nel comparto suinicolo; le considerazioni originate si propongono come riferimento ai fini di evidenziare i punti critici nella prevenzione e nell'eventuale gestione della malattia e di proporre spunti di riflessione utili a tutti gli addetti al settore.

Abstract. In the last decade four epidemics of swine vesicular disease (SVD) occurred in Lombardy Region.
The first one started at the end of October 1998 and finished at the end of February 1999.
Eighteen outbreaks were notified in four provinces: 7 in Cremona, 6 in Mantova, 3 in Brescia and 2 in Bergamo.
Following this epidemic Veterinary Service of Lombardy Region carried out an extraordinary plan aimed at eradicating the disease and achieve the free status from SVD.
The second incursion of SVD virus occurred in the first half of 2000, involving three dealers', two in the province of Mantova, directly linked, and one in the province of Brescia. All the outbreaks were considered primary.
In the third epidemic in 2002, during the routine surveillance activities, SVD was identified simultaneously in a breeding farm and in a dealer's premises of the Bergamo province.
The epidemiological investigations in these two primary outbreaks allowed for the identification of 11 secondary outbreaks, 9 in Lombardy (all in Bergamo province) and 2 in the bordering Veneto and Emilia Romagna regions.
All the secondary outbreaks were a *cul de sac* for the infection; in fact they did not give rise to secondary outbreaks.
During the latest epidemic, started at November 2006 and finished at October 2007, 53 outbreaks were notified and about 148.464 animals were stamped out. Brescia was the province more involved in the spreading of the disease, with 32 outbreaks and the culling of 100.591 heads.
No novelty was available on the mode of the disease transmission intra and inter-herds during the latest SVD epidemic.
The high number of outbreaks and the restriction of the animal movement, due to the persistence of the SVD virus in a densely populated area, caused huge economic losses.
This speech is aimed at comparing the characteristics of the different epidemics occurred in Lombardy Region in the light of the change of swine husbandry.
The epidemiological remarks show the critical points about the prevention and the management of SVD in densely populated areas.

Introduzione

La regione Lombardia è caratterizzata da una superficie di 23.860,62 Km^2 con un patrimonio zootecnico suinicolo d'estrema rilevanza economica, allevato in oltre 5.000 aziende, per un totale di circa 4,5 milioni di suini, che rappresentano il 35% della produzione nazionale.
La densità degli allevamenti suinicoli è la più elevata in Italia con un valore medio di 186,6 suini/km^2, che raggiunge picchi di oltre 2.500 suini/km^2 in certe zone della Pianura Padana.

Indipendentemente dall'estensione territoriale, le province con il maggior numero d'allevamenti e di suini sono, in ordine decrescente, Brescia (1.484 con oltre 2.800.000 capi), Mantova (786 con oltre 1.800.000), Cremona (742 con circa 1.7000.000), Bergamo (453 con circa 743.000).
Per quanto riguarda l'indirizzo produttivo, su un totale di 2.379 allevamenti e 4.461.876 capi, 992 (48,0%) sono da riproduzione con oltre 2.500.000 capi (57%), 1.180 (49,6%) sono da ingrasso con 1.883.000 capi (42,2%).
Il 54,6% degli allevamenti da riproduzione sono a ciclo aperto, il 45,4% a ciclo chiuso.
I dati derivano dal sistema informativo dell'anagrafe zootecnica regionale, aggiornati alla fine del 2006.
Dal 1995 un programma d'eradicazione e di sorveglianza della malattia vescicolare da *enterovirus* del suino (O.M. del 2 dicembre 1994) è applicato sul territorio nazionale.
Inizialmente, il Piano MVS comportò un doppio controllo sierologico, a distanza di 28 giorni l'uno dall'altro, da eseguire nelle aziende da riproduzione (ad eccezione degli allevamenti con un numero inferiore a 6 riproduttori nelle regioni dell'Italia Settentrionale), e con un numero di riproduttori da sottoporre a prelievo in grado di rilevare una prevalenza (P) di sieropositività ≥ 5% con un Intervallo di Confidenza (IC) del 95%.
Nel 1995 l'obiettivo del Piano fu l'accreditamento delle aziende da riproduzione e l'accreditamento induttivo degli allevamenti da ingrasso.
Nel 1996 furono ricontrollate le aziende da riproduzione, comprese quelle con meno di 6 riproduttori, le aziende da ingrasso e tutte le stalle di sosta censite sul territorio.
L'obiettivo del Piano era la conferma dell'accreditamento delle aziende da riproduzione, dell'accreditamento induttivo delle aziende da ingrasso e l'accreditamento delle stalle di sosta. Sulla base dei risultati ottenuti, la regione Lombardia si dichiarò regione accreditata per MVS alla fine del 1996.
L'obiettivo del Piano negli anni successivi fu il mantenimento dello *status* d'indennità per MVS nelle regioni accreditate e l'ottenimento della qualifica da parte delle regioni con problemi d'eradicazione.
Ciò premesso, nell'ultima decade la MVS si è presentata in Lombardia in quattro occasioni: nel 1998-99 (18 focolai), nel 2000 (3 focolai), nel 2002 (14 focolai) e nel 2006-2007 (48 focolai).
Queste incursioni di una malattia infettiva contagiosa per la quale l'OIE richiede specifici piani d'emergenza per contrastarla, hanno sempre avuto ovvie conseguenze economiche a carico del mondo produttivo e della cittadinanza in generale, comportando l'esecuzione di impegnativi piani straordinari di ri-accreditamento.
In occasione dell'ultima epidemia di MVS, il mancato controllo della malattia ha portato alla sospensione dell'accreditamento regionale, decretato dal Ministero della Salute il 13 luglio 2007.

Epidemiologia descrittiva delle epidemie di MVS in Lombardia

Un'epidemia è definita come un numero di casi di malattia superiore all'atteso in un determinato contesto geografico, temporale e di popolazione. L'atteso per MVS pre-

suppone che non vi sia presenza di *enterovirus* sul territorio e di conseguenza non vi sia alcuna circolazione virale.

Prima epidemia
L'epidemia del 1998-99 fu caratterizzata dall'insorgenza di 18 focolai localizzati in 4 province: Cremona (7), Mantova (6), Brescia (3) e Bergamo (2). L'emergenza durò 4 mesi, da novembre 1998 a febbraio 1999, e comportò l'abbattimento di circa 69.000 capi, con un indennizzo di Lire 16.868.559.457.
La denuncia di sospetto di malattia vescicolare fu elevata sulla base della sintomatologia clinica da un allevatore della provincia di Mantova.
Le conseguenti indagini epidemiologiche portarono ad individuare tre allevamenti da riproduzione a ciclo aperto, localizzati in provincia di Cremona, Brescia e Bergamo, che diedero origine a tre foci epidemici. Quello di Cremona generò 8 focolai secondari, tramite la movimentazione d'animali infetti; furono coinvolti anche due allevamenti, localizzati nel Lazio e in Abruzzo, tramite contatti commerciali settimanali di una stalla di sosta, correlata per movimentazione d'animali con il focolaio primario di Cremona. Il *focus* di Brescia portò a 6 focolai secondari, di cui uno nella regione Emilia Romagna, legati a movimentazione d'animali infetti, mentre quello di Bergamo causò un focolaio secondario. In 10 focolai si rilevò presenza di sintomi e/o lesioni tipiche.
L'ipotesi sulla comune origine dei focolai primari si focalizzò sull'introduzione illecita di suini lattoni con stato sanitario sconosciuto e a basso costo in diversi allevamenti, contestuale alla diminuzione del prezzo al mercato del suino.
La diffusione della MVS nelle aziende sede di focolai secondari fu originata dalla movimentazione di suini in 10 casi, dal movimento di persone in 2 casi, da contatti con autoveicoli (trasportatori di carcasse) in 2 casi e dalla contiguità tra allevamenti con spargimento di liquami in campi confinanti in 3 casi.
L'epidemia indusse i servizi veterinari della Lombardia a realizzare un Piano straordinario, ad integrazione di quello nazionale, che tramite l'intensificazione delle misure di sorveglianza e la precoce rilevazione dell'infezione sul territorio portarono all'eradicazione della MVS e al ri-accreditamento regionale.
Elemento caratterizzante di questo piano, valido ancor oggi, è il controllo sierologico nei macelli di suini da riforma/scarto, eseguito su un campione d'animali di tutte le partite portate alla macellazione in una giornata lavorativa, al fine di controllare tutte le giornate di macellazione dell'impianto nell'arco di tre mesi.

Seconda epidemia
La seconda incursione di MVS in Lombardia avvenne nel primo quadrimestre del 2000 e furono notificati tre focolai, di cui due primari, in stalle di sosta ubicate a San Benedetto Po e Moglia in provincia di Mantova, tra loro correlate per movimentazione d'animali infetti, e a Comezzano Cizzago in provincia di Brescia.
Tutti i focolai furono evidenziati tramite isolamento di *enterovirus* da campioni di feci ambientali, prelevati nell'ambito del piano di sorveglianza.
L'origine dei focolai nella provincia di Mantova fu individuata nei contatti commerciali per movimentazione d'animali in entrata e in uscita con stalle di sosta nelle province

di Nocera e Salerno in Campania, regione non accreditata per MVS e sede di recenti e ricorrenti focolai.
Di converso, l'origine del focolaio nella stalla di sosta della provincia di Brescia rimase sconosciuta.
L'esame clinico eseguito sugli animali presenti nei focolai non evidenziò la presenza di sintomi e/o lesioni.

Terza epidemia
La terza epidemia si verificò nel maggio 2002 nella provincia di Bergamo, in cui contemporaneamente si isolò l'*enterovirus* in un allevamento da riproduzione a ciclo aperto nel corso delle attività routinarie di sorveglianza e in una stalla di sosta con una positività rilevata in un animale di scarto prelevato al macello, secondo il piano regionale di controllo integrativo.
Non si riuscì a stabilire quale fosse il caso indice, ma si evidenziò ancora una volta l'esistenza di contatti a rischio con regioni non accreditate e con focolai in atto del sud Italia.
Dai due focolai primari si scoprirono 9 focolai secondari, tutti in provincia di Bergamo, e due nelle vicine regioni Veneto ed Emilia Romagna. Tutti i focolai secondari si dimostrarono a fondo cieco, non originando altri focolai.
Non furono osservati sintomi o lesioni.
In un mese l'epidemia fu circoscritta e la regione riaccreditata con un piano straordinario di controllo.

Quarta epidemia
La quarta epidemia si è verificata a cavallo del 2006-2007 e si è sviluppata in due periodi.
Primo periodo epidemico
La rilevazione dell'infezione è avvenuta nell'ambito del controllo sierologico eseguito su una partita di 80 suini di scarto nell'ottobre 2006 presso un macello della provincia di Bergamo.
I controlli eseguiti su 158 aziende a rischio, individuate con il rintraccio delle partite inviate al macello nelle due settimane precedenti, hanno svelato, all'inizio di novembre, un focolaio di MVS in una stalla di sosta di Verona.
I controlli fatti nelle aziende epidemiologicamente correlate hanno individuato altri 7 focolai in Veneto e hanno aperto il fronte dell'epidemia in Lombardia.
Più precisamente, i contatti tra la stalla di sosta e gli allevamenti suinicoli nelle province di Mantova, Brescia e Bergamo, finalizzati al ritiro di scrofe a fine carriera e di suini magroni/grassi di scarto, hanno originato due foci epidemici distinti dal punto di vista geografico, uno in provincia di Brescia/Bergamo e uno in provincia di Mantova.
Complessivamente, in questo primo periodo epidemico, durato poco più di tre mesi come la prima epidemia del 1998/99, sono stati individuati 36 focolai e 23 aziende sieropositive.
Per quanto riguarda i focolai, le province interessate sono state Brescia (20), Mantova (10), Bergamo (2), Milano (2), Lodi (1), Sondrio (1).

Diciassette dei focolai evidenziati sono stati individuati in aziende da ingrasso (47,2%), 16 in aziende da riproduzione (44%) e 3 in stalle di sosta (8,3%).
La provincia di Brescia è stata sede di ben 20 focolai secondari, di cui 10 in aziende da riproduzione, 8 in aziende da ingrasso e 2 in stalle di sosta.
In provincia di Mantova si sono verificati 10 focolai, di cui 7 in aziende da ingrasso (uno primario), 2 in aziende da riproduzione, 1 in una stalla di sosta. L'azienda da ingrasso sede del focolaio primario era del medesimo proprietario della stalla di sosta.
Bergamo è stata colpita da 2 focolai secondari in aziende da riproduzione.
Milano è stata coinvolta con 2 focolai, uno primario in un'azienda da riproduzione e uno secondario in un'azienda da ingrasso.
Lodi e Sondrio sono state interessate marginalmente con due focolai secondari, uno in un'azienda da riproduzione e l'altro in un'azienda da ingrasso.
E' stato possibile risalire all'origine dell'infezione in 34 su 36 focolai (94,4%), mentre è rimasta ignota in 2 su 36 (5,5%). Segni clinici e lesioni sono stati individuati in 14 su 36 focolai (39%).
Sulla base delle informazioni disponibili non è stato possibile stabilire con certezza l'origine dell'infezione, dai risultati delle indagini epidemiologiche può però essere ipotizzato il periodo a rischio, che, viste le correlazioni esistenti fra una stalla di sosta del Veneto ed un'azienda da riproduzione di Brescia, sarebbe da far risalire almeno all'inizio del mese d'agosto (contatto a rischio avvenuto il 29 agosto 2006).
Inoltre, durante le attività di sorveglianza ordinaria è stata individuata un'azienda sieropositiva (sieropositività diffusa per anticorpi di classe IgG) nella provincia di Bergamo. Per quest'azienda non è stata stabilita l'origine dell'infezione, anche se ha avuto un contatto (vendita suini) nel mese di giugno con una piccola azienda campana, a sua volta risultata sieropositiva.
Dai risultati delle indagini epidemiologiche effettuate nelle aziende sede di focolaio e per le quali è stato possibile individuare l'origine dell'infezione l'origine dell'infezione è da ricondurre a:
– introduzione di suini provenienti da aziende sede di focolaio (12);
– ingresso di veicoli contaminati allo scopo di ritirare scrofe a fine carriera/scarti (7) o carcasse (4);
– ingresso di personale contaminato (3);
– contiguità con aziende sede di focolaio (8) e spandimento del liquame proveniente da aziende a loro volta sede di focolaio.

Secondo periodo epidemico
L'epidemia di MVS sembrava controllata e la malattia estinta a fine febbraio 2007. Viceversa, a maggio, dopo un silenzio epidemiologico di 3 mesi, la malattia è ricomparsa in un'azienda della provincia di Cremona, che non era stata ancora colpita.
Questo nuovo focolaio ha dato il via al secondo periodo epidemico, durato fino al 22 ottobre 2007, durante il quale sono emersi 17 focolai e 4 aziende sieropositive.
Le province interessate dai focolai sono state quelle di Cremona (4), Brescia (12), Bergamo (1).
Ad eccezione del focolaio di Bergamo, che è stato individuato al mattatoio, i focolai di

MVS del secondo periodo epidemico si sono verificati in una zona ben delimitata a cavallo tra le province di Brescia e di Cremona. I comuni interessati della provincia di Brescia, sono da considerarsi ad elevata densità suinicola ed erano già stati coinvolti nel precedente periodo, due aziende sono state sede di focolaio sia nel primo che nel secondo periodo.
Per quanto riguarda le tipologie produttive, sono state coinvolte 10 (58,8%) aziende da riproduzione, 6 (35,3%) aziende da ingrasso ed un macello a capacità limitata in provincia di Bergamo.
Brescia, con 12 focolai, è stata la provincia più colpita, di cui 8 individuati in aziende da riproduzione (5 primari) e 4 in aziende da ingrasso, di cui 3 primari.
Cremona segue con 4 focolai, di cui 2 in aziende da riproduzione (1 primario), 2 in aziende da ingrasso, entrambi primari.
In provincia di Bergamo è stato individuato un focolaio in un macello a capacità limitata, per il quale non è stato possibile risalire all'origine dell'infezione.
Segni clinici e lesioni sono stati individuati in 16 su 17 focolai (94,1%). Non vi sono stati casi di mortalità o letalità legati alla malattia.
La provincia maggiormente colpita è stata quella di Brescia con 12 focolai, di cui 10 primari.
Nel distretto veterinario d'Orzinuovi (BS) se sono verificati 10, di cui 5 nel comune di San Paolo.
Il distretto d'Orzinuovi è un'area ad elevata densità suinicola (oltre 1.400 suini/Kmq) e tra i comuni maggiormente interessati c'è quello di San Paolo che ha una superficie di 18 Kmq in cui sono allevati 54.000 suini in 17 aziende, con una densità di circa 3.000 suini/kmq. Questo comune è stato interessato sia nel primo periodo epidemico con 4 focolai sia nel secondo con 5, per un totale di 8 aziende colpite, poiché una di loro è stata sede di focolaio in entrambi i periodi. Questi numeri documentano l'elevatissimo rischio per la diffusione di malattie in zone ad alta densità zootecnica.
A differenza del primo periodo epidemico in cui le indagini epidemiologiche avevano permesso di risalire
all'origine dell'infezione in 34 su 36 focolai, nel secondo la fonte è rimasta sconosciuta in ben 12 casi su 17 ed è stata stabilita solo nel caso d'aziende controllate, perché appartenenti alla stessa proprietà. La diffusione è avvenuta tra aziende contigue, comprese in un'area di 10 Kmq.
La presenza d'aziende sieropositive nella provincia di Lecco, Brescia, Cremona e Bergamo ha suggerito l'ipotesi che fossero rimasti *foci* d'infezione dal precedente periodo epidemico. Quest'ipotesi è stata suffragata dalla comparazione dei dati delle sequenze nucleotidiche degli *enterovirus i*solati.
Tutti i ceppi isolati in Italia Settentrionale da novembre 2006 appartengono ad una linea genomica evolutasi in Italia, a partire da capostipiti introdotti per la prima volta nel 1992.
Piccole differenze nucleotidiche hanno permesso, tuttavia, di distinguere due cluster genetici.
La prima ondata epidemica ha colpito Lombardia, Veneto e marginalmente Emilia Romagna ed è stata determinata da virus omologhi, appartenenti ad un primo cluster.

La seconda ondata è stata causata da virus appartenenti ad un secondo cluster, originato dal precedente ma differenziabile. L'omologia tra questi ceppi ha indicato che il virus circolante è stato il medesimo.
Ha fatto eccezione il ceppo isolato presso un macello della provincia di Bergamo, che appartiene al primo cluster, suggerendo la persistenza del virus presente in zona nella prima ondata epidemica.
Il secondo periodo epidemico ha esordito nel maggio 2007con il focolaio in un allevamento da ingrasso nella provincia di Cremona, in cui il profilo genetico del virus è risultato intermedio rispetto ai virus implicati nei due cluster susseguenti e che potrebbe aver costituito il punto di passaggio.
Complessivamente, l'epidemia 2006-2007 si è connotata per l'insorgenza di 53 focolai, 27 aziende sieropositive e l'abbattimento di 148.464 capi. La malattia si è manifestata con sintomatologia clinica evidente e con lesioni tipiche in 30 aziende e la provincia più colpita è stata quella di Brescia con 32 focolai e 100.591 capi abbattuti.
La figura 1 rappresenta la distribuzione dei focolai di MVS verificatisi in Lombardia da novembre 2006 ad ottobre 2007.
Nella figura 2 è visualizzata la curva epidemica cumulativa con il numero di focolai per settimana, il cui andamento è caratterizzato da due ondate. La prima ondata esordisce a metà novembre con il suo picco a metà dicembre 2006 e una successiva progressiva diminuzione tra fine dicembre 2006 e inizio febbraio 2007.
Dopo un silenzio di circa tre mesi la malattia ricompare ad inizio maggio e diventa endemica con uno stillicidio di focolai terminato a fine ottobre 2007.

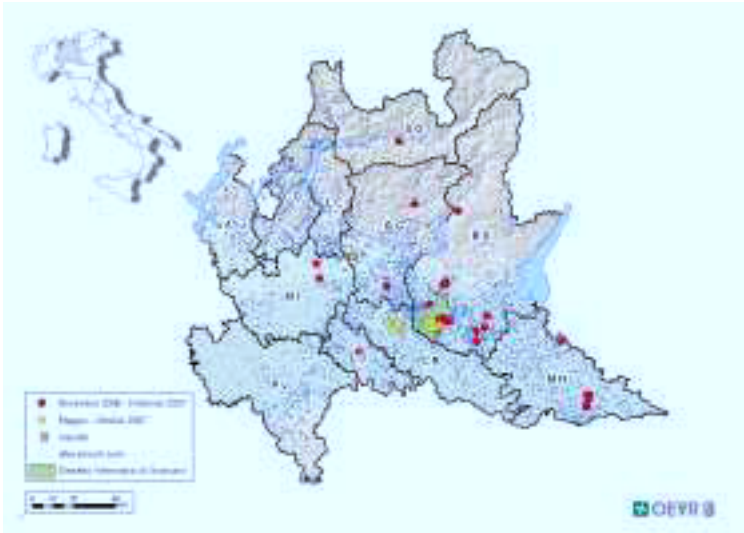


Fig. 1. Distribuzione dei focolai MVS in Lombardia nel 2006-2007.
Fig. 1. *Distribution of the SVD outbreaks occurred in Lombardy in 2006-2007.*

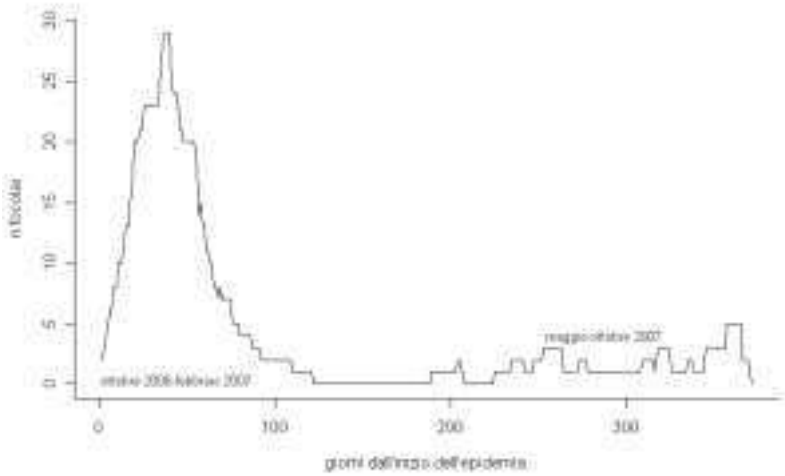


Fig. 2. Curva epidemica della MVS in Lombardia nel 2006-2007.
Fig. 2. *Epidemic curve of SVD in Lombardy Region (2006-2007)*

Discussione e conclusioni

Il confronto tra le diverse epidemie di MVS succedutesi in Lombardia nell'ultima decade evidenzia l'importanza della movimentazione di suini infetti quale principale causa di trasmissione di malattia, seguita dalla contiguità tra aziende, dalla movimentazione d'automezzi, di persone.
Il fattore di rischio più frequente d'introduzione di MVS è stato il contatto con regioni non accreditate o la commercializzazione d'animali con stato sanitario ignoto.
Sintomi clinici di malattia sono stati riportati sia nella prima che nell'ultima epidemia, entrambe caratterizzate da un elevato numero di focolai e dal tempestivo rintraccio degli allevamenti che hanno avuto contatti pericolosi.
Ciò ha aumentato la sensibilità di rilevazione della sintomatologia, consentendo di eseguire la visita clinica su animali con infezione recente.
D'altro canto, si rammenta che la prima epidemia è stata scoperta grazie all'autodenuncia di malattia da parte di un allevatore e anche nel più recente episodio vi sono state due segnalazioni di casi sospetti da allevatori.
Ciò dimostra che "locchio clinico" (sorveglianza passiva) da parte di chi governa quotidianamente gli animali consente di rilevare precocemente la malattia.
La rilevazione di sintomi e lesioni tipici di malattia vescicolare, come le vescicole a livello del grugno, del cercine coronario del piede e dello spazio inter-ungueale, zoppia, disoressia, ipertermia, ottundimento del sensorio nei casi acuti, ha confermato quanto descritto in letteratura. Non vi sono mai stati casi di letalità e mortalità, a dimostrazione della prognosi favorevole della malattia.
La diffusione all'interno dell'allevamento si è concentrata a livello di box o di singoli capannoni, in funzione della rapidità di rilevazione di malattia.

Il piano di sorveglianza della MVS in allevamento, integrato in Lombardia dal controllo sierologico eseguito al macello sugli animali di scarto e da riforma, ha dimostrato nelle ultime tre epidemie di essere un'arma efficace ai fini della rilevazione attiva dell'infezione sul territorio.
In tutti i casi, il periodo presunto di introduzione dell'infezione è stato fatto risalire a due - tre mesi precedenti la scoperta del primo focolaio.
La morbilità localizzata (malattia da box) e la contenuta diffusione intra-allevamento all'inizio dell'infezione, la difficoltà di rilevare i sintomi, l'assenza di letalità e mortalità sono i motivi per cui la malattia, generalmente, è scoperta tramite il monitoraggio sierologico, finalizzato ad escludere la presenza d'anticorpi contro il virus e a certificare lo stato d'accreditamento dell'azienda.
Il coinvolgimento cruciale delle stalle di sosta come punto di contaminazione e d'amplificazione della diffusione dell'infezione è stato constatato in tutte le epidemie.
Il ruolo dei macelli non è stato secondario, poiché anch'essi si trovano vicino ad allevamenti in zone densamente popolate e rappresentano punti di contaminazione e di diffusione della malattia, attraverso gli automezzi non correttamente lavati e disinfettati.
Nella prima ondata dell'ultima epidemia l'infezione è diffusa tramite i contatti commerciali tra una stalla di sosta del veronese con aziende del mantovano e bresciano per il ritiro d'animali di scarto e da riforma.
L'implementazione delle norme di biosicurezza negli allevamenti e nei macelli, e l'effettiva pulizia, lavaggio e disinfezione degli automezzi, ancorché misure previste dalla normativa e molto vincolanti nella valutazione del rischio d'introduzione della malattia, nella maggior parte dei casi non sono state rese realmente operative, se non parzialmente.
Analogamente, l'evoluzione spazio-temporale della malattia, anche nella prima ondata dell'epidemia più recente, si è conformata alla classica curva epidemica di una malattia infettiva, che esordisce, raggiunge un picco di casi e, più o meno lentamente, decresce fino a scomparire.
Fino a qui le similitudini circa le caratteristiche epidemiologiche delle emergenze di MVS, già espresse al tempo dell'epidemia del 1998 e che sono state confermate nell'ultima esperienza.
Inoltre, è utile sottolineare che dal punto di vista normativo la gestione della MVS, patologia in sé ben conosciuta nei suoi meccanismi di trasmissione e modalità di diffusione, non ha subito cambiamenti.
Passando alle peculiarità che hanno caratterizzato l'ultima grave epidemia, sono diversi gli aspetti su cui ci si deve soffermare per capire ciò che è successo, non solo riguardo all'ipotesi di come la malattia è penetrata, ma anche le ragioni per le quali è rimasta sul territorio per un anno, prima di essere eradicata con un intervento straordinario di de-popolamento, eseguito in aziende ritenute a rischio di contaminazione, ubicate in un'area infetta e ben circoscritta della provincia di Brescia.
Cosa è cambiato rispetto alla prima epidemia del 1998-1999?
Innanzitutto il profilo demografico. Il patrimonio suinicolo è passato da circa 3 milioni di capi nel 1995 (Istat 1997) a circa 4,5 milioni nel 2007 (anagrafe regione Lombardia), con un aumento della densità di suini per Km^2 da 120,7 a 186,6.

Dal 1996 al 2007 il numero d'aziende suinicole controllate per MVS è aumentato di oltre il 50%; a livello regionale (1.800 *vs* 3.078), nella provincia di Brescia (507 *vs* 900), nel distretto di Orzinuovi (93 *vs* 150), nel comune di San Paolo (11 *vs* 17).
La maggior densità ha portato ad un incremento del rischio di trasmissione dell'infezione per contiguità, a causa dell'esigua distanza tra aziende (entro 1.000 metri) e per la condivisione di pratiche zootecniche su aree agricole confinanti.
Nel primo periodo era emerso un cluster di 9 focolai nel comune di San Benedetto Po (MN) in un'area di 4 Kmq; nel secondo periodo epidemico le 12 aziende colpite in quattro comuni limitrofi della provincia di Brescia (San Paolo, Orzinuovi, Borgo San Giacomo e Verolanuova) hanno costituito un unico focolaio endemico in un'area di appena 10 Km^2.
Il contenimento della diffusione dell'infezione ha presentato difficoltà supplementari, legate anche all'elevata produzione di virus, molto resistente nell'ambiente; di qui la decisione di depopolare la zona, individuando le aziende a rischio di contaminazione.
Un'altra specificità nell'organizzazione dell'allevamento suino odierno è la sempre maggiore diffusione d'aziende integrate o multi-sito, che seguono l'intero ciclo produttivo dell'animale, dalla nascita in scrofaia (sito 1), allo svezzamento (sito 2), all'ingrasso (sito 3). Se da un lato questa strutturazione della filiera produttiva è funzionale alla compartimentalizzazione del settore e prevede un più alto livello d'applicazione delle misure di biosicurezza, dall'altro ha rappresentato un punto critico nella gestione dell'epidemia, a causa della dislocazione dei siti in aree ad elevatissima densità d'aziende, anche in province diverse. In tali situazioni è fondamentale ridurre al minimo i contatti a rischio d'infezione, il cui ingresso nel circuito integrato coinvolgerebbe numerose aziende e diverse province. Nel caso dell'ultima epidemia, si sono evidenziate sieropositività per MVS circoscritte e senza isolamento virale in alcuni siti, che sono risultati fondi ciechi per la diffusione dell'infezione.
Nondimeno, la presenza d'anticorpi in animali appartenenti ad un circuito integrato ha testimoniato l'avvenuto contatto a rischio.
Infine, gli allevamenti d'ingrasso hanno avuto un ruolo attivo nella diffusione dell'infezione (4 focolai primari) verso gli allevamenti da riproduzione, attraverso il ritiro degli scarti o, nel caso dei cicli chiusi, tramite il governo comune degli animali, anche se gli allevamenti erano dislocati a distanza di sicurezza l'uno dall'altro.
Le analogie e le differenze emerse dall'analisi delle epidemie di MVS occorse in Lombardia portano a dover definire una politica condivisa di gestione territoriale dell'allevamento suino e dell'industria ad esso correlata, che sia compatibile e sostenibile dal punto di vista sanitario e non solo economicamente vantaggiosa dal punto di vista commerciale.
Le misure di tutela igienico-sanitaria sono il fondamento della buona pratica di allevamento per ridurre il rischio d'introduzione di malattie; ciononostante, in zone ad elevatissima densità zootecnica come quelle riscontrate nelle province di Brescia, Mantova e Cremona, tali misure possono rivelarsi insufficienti a contrastare la diffusione di una malattia contagiosa.
Questa constatazione dovrebbe far riflettere sulla possibilità di un ripensamento nell'organizzazione dell'allevamento suinicolo moderno.

Oggigiorno, il controllo delle malattie infettive contagiose non può prescindere dall'analisi obiettiva della politica d'espansione zootecnica in ambito suinicolo, prevalentemente sbilanciata verso una logica economica rispetto a quello sanitaria. E' necessario acquisire la consapevolezza di dimensionare il comparto suinicolo (allevamenti e macelli) in funzione della sicurezza sanitaria, da cui deriva la tutela commerciale della filiera, il riscontro economico alla professionalità degli allevatori, l'affidabilità di un sistema sanitario regionale e nazionale e la possibilità di gestire eventuali emergenze, causate dall'ingresso di malattie ad alta contagiosità come l'afta epizootica.

Bibliografia

Zanardi G. (1999) "Malattia vescicolare del suino da *enterovirus*: considerazioni epidemiologiche in seguito ai focolai verificatisi in Lombardia nel 1998/99". Tesi della Scuola di specializzazione in Diritto e legislazione veterinaria presso l'Università degli studi di Milano - anno accademico 1998-1999, 1-57.

Zanardi G. (2001) "Considerazioni epidemiologiche sulla malattia vescicolare del suino in seguito ai focolai verificatisi in Lombardia nel 1998/99". Eurocarni, anno XVI, 10, 63-71

Zanardi G., Tranquillo V.M., Bellini S. (2002) "Considerazioni preliminari sui focolai di malattia vescicolare del suino in Lombardia nel 2002". L'Osservatorio, anno.5, 3, 6-11.

Zanardi G., Bellini S., Tranquillo V.M., Avisani D. & Bonacina C. (2003) "Epidemiological features of swine vesicular disease outbreaks in Lombardy region (Italy) during 2002". Proceedings X International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE) 17-21 novembre 2003 – Vi?a del Mar – Chile

Bellini S., Abrami S., Cominardi F., Nigrelli A., Zanardi G., Brocchi E., Alborali L. (2007) "Malattia vescicolare del suino: analisi dei fattori di rischio evidenziati nei focolai lombardi al fine della predisposizione di misure di biosicurezza". Atti XXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Modena, 213-223.

Zanardi G., Antoniolli P., Gemma Brenzoni L., Tranquillo V.M., Bonazza V., Bellini S.,. Avisani D (2007) "La malattia vescicolare del suino in Lombardia". L'Osservatorio, anno 10, 2, 3-12

Bellini S., Zanardi G., Avisani D., Gradassi M., Nassuato C., Alborali L. (2007) "Swine vesicular disease: analysis of the risk factors highlighted in the outbreaks detected in Lombardia region in order to carry out biosecurity guideline". First Annual Meeting Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control. May 30 – June 2007, Lublin/Pulawy, Poland, 135.

Bellini S., Avisani D., Alborali L., Bonazza V., Brocchi E., Zanardi G. (2007) "Malattia vescicolare del suino in Lombardia 2006-2007". L'Osservatorio, anno 10, 5, 4-9

GESTIONE DEI FOCOLAI: ASPETTI OPERATIVI E CRITICITÀ

OUTBREAKS MANAGEMENT: PERSPECTIVES AND CRITICAL POINTS

SILVESTRO ABRAMI *, MARIO COVI*, PIERFRANCO COMINARDI*,
G. LORIS ALBORALI **
** ASL Brescia ** IZSLE Sezione Diagnostica di Brescia*

Riassunto. Il riferimento normativo è il D.P.R. 17/05/1996 n.362 di attuazione della direttiva 92/119/CEE che introduce misure generali di lotta contro talune malattie degli animali, nonché misure specifiche per la malattia vescicolare dei suini e il Piano di emergenza/manuale operativo predisposto dal Centro di Referenza di Brescia (CERVES).
I provvedimenti in zona di protezione e sorveglianza sono complessi, severi e onerosi anche dal punto di vista amministrativo .La situazione diventa tanto più critica, quanto più compaiono nuovi focolai di MVS e di conseguenza si allungano i tempi necessari per i controlli e la revoca dei provvedimenti. Particolarmente accurata dev'essere la gestione dei controlli sierologici e clinici presso gli allevamenti. Importantissimo il flusso informativo sia per i Comuni/Regione/Ministero che per gli Allevatori, le loro Associazioni e i Media.
Per l'estinzione del focolaio in tempi rapidi è necessario disporre di un protocollo operativo che abbia come obiettivo: la garanzia della minor dispersione di virus nell'ambiente , il rispetto della sicurezza e salute dei lavoratori sui luoghi di lavoro e la protezione degli animali durante l'abbattimento. Le operazioni di abbattimento risultano complesse ed in allevamenti di dimensioni notevoli determinano una importante contaminazione ambientale, fonte di rischio nelle aree densamente popolate. Altri elementi caratterizzanti sono la pulizia e disinfezione degli allevamenti, la corretta sanificazione dei reflui e il ripopolamento delle aziende con un adeguato numero di sentinelle. Ultimo adempimento delicato e oneroso è l'iter per l'indennizzo agli allevatori sia sotto l'aspetto documentale che tecnico.

Abstract. The legislative reference is the Decree of the President of the Republic 17 May 1996 n 362, implementation of the UE/119/92 laying down general measures for the control of certain animal diseases as well as some specific measures for the Swine Vesicular Disease (SWD) and the Emergency Plan/ Operative Manual drafted by the Vesicular Diseases Reference Centre of Brescia (CERVES).
Measures adopted in protection and surveillance areas are complex, strict and onerous also from an administrative point of view. The situation becomes more critical as more new outbreaks of SVD break down and then time needed for controls and measures revocation gets greater. The management of the serological and clinical controls in the herds should be especially accurate. Particularly important is the informative flow both for Municipalities, Region and Ministry and for farmers, their Associations and the media.

In order to eradicate outbreaks as quickly as possible should be available an operative protocol aimed to guarantee:
that the spreading of the virus is as less as possible,
the safety and health of workers,
the animals protection during culling operations.
Culling operations are complex and in case of big sized herds can lead to high contamination level of the environment, eventual risk source in high animal density areas. Other elements are cleaning and disinfections of the herds, proper sanitation of sewage and introduction in the herds of a correct number of guard animals. The last action, sensitive and onerous both administratively and technically, is the *iter* to get the indemnity for farmers.

Introduzione

Il patrimonio suinicolo dell'A.S.L. di Brescia è il più importante della Regione Lombardia con 800 allevamenti e oltre n. 1.400.000 capi allevati. Le modalità di allevamento sono fortemente mutate negli ultimi 10 anni, passando da allevamenti monosito (dove gli animali nascono e lasciano l'allevamento solo per la macellazione) ad allevamenti specializzati multisito (dove è fortissima la movimentazione degli animali, che nascono al sito 1, crescono nel sito 2, ed ingrassano ai fini della macellazione al sito 3). In tutti gli allevamenti di riproduttori si registra un costante ingresso di animali da rimonta da allevamenti esterni. Questo determina un forte incremento dei movimenti di mezzi e persone.
Nel secondo periodo epidemico, da maggio al 22 ottobre 2007, sono stati individuati 17 focolai e 4 aziende sieropositive. Le province interessate dai focolai quelle di Cremona (4), Brescia (12), Bergamo (1). Ad eccezione del focolaio di Bergamo, che è stato individuato al mattatoio, i focolai di MVS del secondo periodo epidemico si sono verificati in una zona ben delimitata a cavallo tra le provincia di Brescia e quella di Cremona.
I comuni interessati della provincia di Brescia, sono da considerarsi ad elevata densità suinicola ed erano già stati coinvolti nel precedente periodo, due aziende sono state sede di focolaio sia nel primo che nel secondo.
In provincia di Brescia il primo focolaio della malattia è stato riscontrato in data 3/07/2007 e successivamente si sono avuti altri 11 focolai che hanno comportato l'adozione di provvedimenti restrittivi e l'abbattimento di n. 47.436 capi suini. Il distretto veterinario in cui sono stati segnalati 11 focolai è quello di Orzinuovi ; in particolare nel comune di San Paolo sono stati individuati 5 dei 12 focolai emersi nella provincia. Il distretto di Orzinuovi è un'area ad elevata densità suinicola (oltre 1.400 suini/Kmq) e tra i comuni maggiormente interessati c'è quello di San Paolo che ha una superficie di 18 Kmq e una densità di oltre 2.500 suini/kmq.
Alla fine del mese di ottobre 2007, in considerazione del ripetersi dei focolai in questa zona, si è ipotizzata l'adozione di un intervento straordinario tendente a eradicare definitivamente la MVS dal territorio della Provincia di Brescia limitando il rischio di possibile diffusione ad altre zone. In accordo con la Regione Lombardia e il Ministero

della Sanità è stato adottato un provvedimento straordinario per il depopolamento di un'area (figura 1) particolarmente a rischio per accelerare i tempi di eradicazione della malattia. In questa operazione si è proceduto all'abbattimento di n. 44.205 capi in 15 allevamenti.

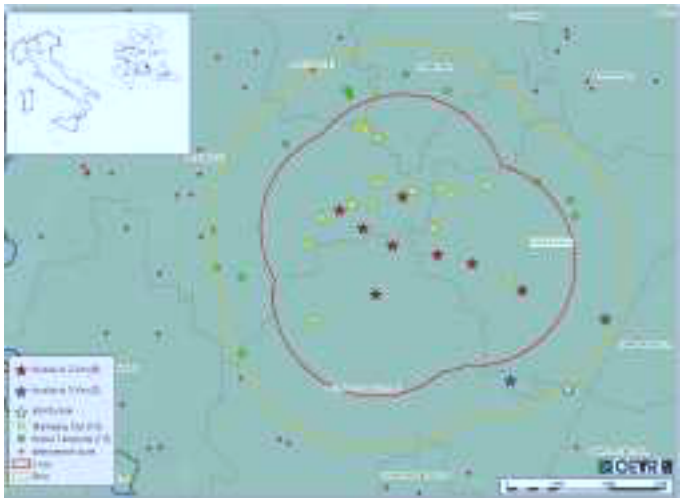


Fig. 1. Area interessata al piano di depopolamento

I successivi controlli, sempre effettuati nel rispetto della tempistica prevista dalle norme Comunitarie, hanno fornito esito favorevole per cui, in data 14 gennaio 2008 , sono stati revocati i provvedimenti restrittivi (il DPR 362/96 prevede che l'applicazione delle misure presso le aziende della zona di protezione sono mantenute almeno sino a che i suini presenti in tutte le aziende siano stati sottoposti ad un esame clinico e ad un esame sierologico favorevole di un campione statisticamente significativo, trascorsi almeno 28 giorni dal completamento delle operazioni preliminari di pulizia e disinfezione nell' azienda infetta).
Nel corso di questa grave epizoozia, sono stati impegnati oltre 100 veterinari fra ufficiali convenzionati e aziendali che hanno effettuato n. 4.659 ingressi e n. 255.744 prelievi ematici per i controlli sierologici. Trattasi di una attività imponente mai prima effettuata in ambito nazionale.

Materiali e Metodi

Legislazione Comunitaria e Nazionale
Direttiva 92/119 CEE del Consiglio del 17 dicembre 1992: che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie nonchè misure specifiche per la malattia vescicolare dei suini.

Decisione 2005/779/CE della Commissione del 8 novembre 2005: relativa a talune misure sanitarie di protezione contro la malattia vescicolare dei suini in Italia e successive modifiche
DPR 362/96 del 17 maggio 1996: regolamento recante norme per l'attuazione della direttiva 92/119/CEE, del Consiglio del 17 dicembre 1992, che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie degli animali, nonchè misure per la malattia vescicolare dei suini.
OM 26 luglio 2001: piano nazionale di eradicazione e sorveglianza della Malattia Vescicolare e sorveglianza della Peste Suina Classica.
Piano di emergenza / manuale operativo del Centro di referenza di Brescia – scaricabile dal sito del CERVES.
Ulteriori provvedimenti adottati a livello regionale (Decreti D.G. Sanità del 26 giugno, 19 e 25 luglio 2007):
– riaccreditamento di tutte le aziende della Regione
– obbligo della visita entro 48 prima del carico
– obbligo di inviare le partite di suini direttamente a destino (divieto di carichi multipli)
– vincolo per le stalle di sosta di invio degli animali esclusivamente e direttamente al macello
– vincolo per i suini di scarto e da riforma di destino esclusivamente e direttamente al macello con automezzo sigillato
– previsione di dotazioni minime di biosicurezza per tutti gli allevamenti
– obbligo per i macelli di suini di garantire almeno settimanalmente lo svuotamento delle stalle ai fini della completa e corretta pulizia e disinfezione
– disposizioni specifiche per il lavaggio e disinfezione degli automezzi negli allevamenti e presso gli impianti di macellazione
– aumento del numero di campioni da prelevare ai fini del controllo della MVS negli allevamenti con più unità strutturali (20 campioni per capannone fino ad un massimo di 120 per allevamento)
– negli allevamenti della Provincia di Brescia (al di fuori delle zone di protezione e sorveglianza) che movimentano animali controlli ogni 28 giorni e prenotifica dell'invio al Servizio Veterinario di destinazione.

Servizi Veterinari - ASL di Brescia
area centrale: Dipartimento di Prevenzione Veterinario con 3 Servizi
aree territoriali: Distretti Veterinari (figura 2) - Brescia, Lonato, Montichiari, Leno, Orzinuovi e Rovato

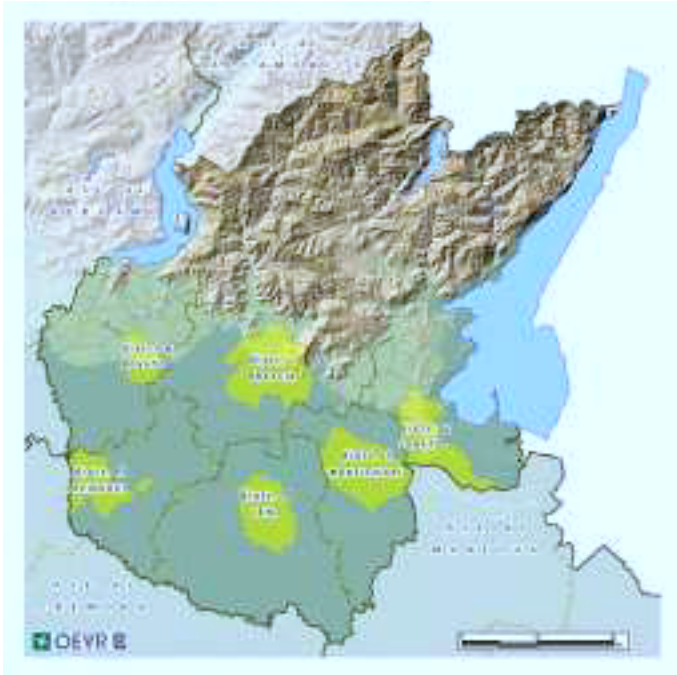


Fig. 2. Distretti Veterinari

SCHEMA OPERATIVO IN CASO DI INFLUENZA AVIARIA
o malattie notificabili Dec 2004/216/CE

SEGNALAZIONE DI SOSPETTO

- Allevatore,
- Veterinario Libero .Professionista
- ….

↓

VETERINARIO UFFICIALE
referente dell'allevamento

↓

IN DISTRETTO

(o luogo diverso dall'allevamento)

- Impartisce disposizioni verbali atte ad impedire la diffusione della malattia.
- Raccoglie informazioni riguardanti:
  - l'ubicazione, tipologia e consistenza dell'allevamento;
  - persone e mezzi già presenti in allevamento;
  - eventuali movimentazioni in entrata/uscita di mezzi, materiali e persone;
  - eventuale presenza in allevamento di disinfettanti e mezzi di disinfezione.
- Avvisa IZS competente per territorio.
- Contatta la stazione mobile di disinfezione in modo che si attivi appena necessario.
- ***Recupera il* KIT D'INTERVENTO**

- COMUNICA IN VIA BREVE

- DPV Dir. Servizio SA (> informazione a Dir San.)
- Dir. Distretto MV
- DPM Dir. Comparto Igiene e San. Pub.

↓

Si reca al più presto

IN *ALLEVAMENTO*

ALL' INGRESSO DELL'ALLEVAMENTO

- Fermare la macchina all'esterno;
- Indossare idonei indumenti monouso e idonei DPI;
- Prevedere nella zona di cambio abiti un contenitore idoneo per la raccolta dei dispositivi ed indumenti utilizzati durante il sopralluogo con idonea soluzione di disinfettante, guanti in nitrile e sacchi di plastica;
- Trasportare il restante materiale del KIT in allevamento

ALL' INTERNO DELL'ALLEVAMENTO

OPERAZIONI PRELIMINARI

- Compilare Verbale di sequestro cautelativo (n° capi presenti e categoria).
- Dichiarazione di impegno del personale.
- Individuare i punti di accesso in allevamento idonei per lavaggio/disinfezioni dei mezzi in uscita.
- Individuare i punti idonei per lavaggio/disinfezioni del personale in uscita.
- Organizzare il lavaggio e la disinfezione dei mezzi e del personale in uscita.

ACCERTAMENTI

- Identificare la topografia dell'allevamento (strutture, reparti);
- Identificare il reparto o il capannone dove è segnalato il sospetto;
- Identificare le persone addette;
- Raccogliere informazioni anamnestiche;
- Effettuare un'accurata Indagine Clinica per definire la situazione sanitaria
- Prelevare i campioni e compilare la scheda campioni
- Invio campioni all'IZS con l'ausilio di un Vigile Sanitario/Tecnico che rimane all'esterno dell'allevamento

NOTIFICA SOSPETTO FOCOLAIO

- procedere all'apposizione, all'ingresso dell'azienda, del cartello previsto;
- compilare (nel caso di IA): "Comunicazione persone esposte per SISP (Area funzionale igiene e sanità pubblica della DGD territorialmente competente);
- Verificare le modalità di estinzione dell'eventuale focolaio

STESURA dell'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Da compilare in modo dettagliato ed esaustivo, con particolare riferimento alle movimentazioni di animali, prodotti, personale da e per l'azienda, ai contatti diretti/indiretti, essenziali per individuare precocemente la fonte d'infezione, gli allevamenti a rischio e l'estensione dell'area a rischio

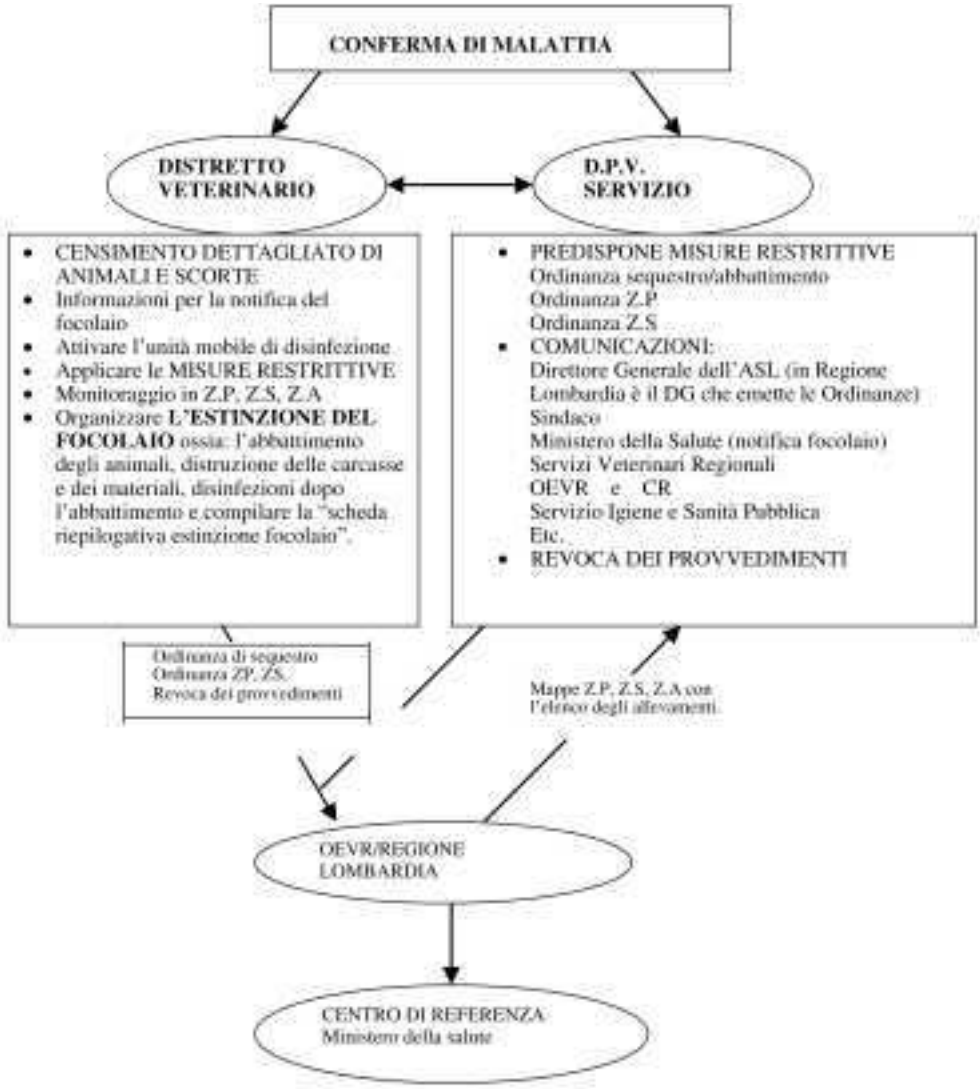
Procedere in modo dettagliato ed esaustivo di ogni sua parte alla stesura

ALL' USCITA DELL'ALLEVAMENTO

- Disinfettare lo strumentario utilizzato e riciclabile e raccoglierlo in sacchi per la successiva disinfezione;
- Raccogliere il materiale non disinfettabile (es. materiale cartaceo da riutilizzare) in sacchetti di plastica trasparenti
- Raccogliere le tute o qualsiasi altro materiale destinato alla distruzione, nell'apposito sacco di plastica che rimane in allevamento

IN DISTRETTO

- Inviare copia verbale di prescrizioni e sequestro cautelativo e NOTIFICA del SOSPETTO:
- DPV- Servizio sanità animale che invierà:
  - Servizi Veterinari Regionali - Ministero della Salute - OEVR
- Inviare l'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA: OEVR
- Inviare MODELLO RACCOLTA DATI PERSONE ESPOSTE AL CONTATTO: - Servizio Igiene e Sanità Pubblica (Area funzionale igiene e sanità pubblica della DGD competente)



LEGENDA: IZS: Istituto Zooprofilattico Sperimentale
DPV: Dipartimento Prevenzione Veterinaria
SA: Sanità Animale
DMV: Distretto di Medicina Veterinaria
DPM: Dipartimento di Prevenzione Medico
DPI: Dispositivi di Protezione Individuali
DGD: Direzione Gestionale Distrettuale
OEVR: Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale (Lombardia)
CR: Centro Referenza
ZP: Zona Protezione
ZS: Zona Sorveglianza
ZA: Zona Attenzione
DG: Direttote Generale
SISP: Servizio Igiene Sanità Pubblica

Pare opportuno sottolineare che le operazioni di abbattimento risultano complesse ed in allevamenti di dimensioni notevoli (5-7000 capi) determinano una importante contaminazione ambientale, fonte di rischio nelle aree densamente popolate. Non da meno sono le problematiche relative al trasporto e alla distruzione delle carcasse.

Protocollo operativo delle operazioni di abbattimento nei focolai di MVS

Obiettivo
1) abbattimento ed invio ad impianto di incenerimento degli animali infetti o sospetti contaminati:
a) in tempi rapidi, ma con la garanzia della minor dispersione di virus nell'ambiente;
b) nel rispetto del D.Lgs. 626 del 19/09/94 (sicurezza e salute dei lavoratori sui luoghi di lavoro) e uso dei D.P.I;
c) nel rispetto del D.Lgs. 333/98 protezione degli animali durante la macellazione o l'abbattimento *(le operazioni devono essere condotte in modo tale da risparmiare agli animali eccitazioni, dolori e sofferenze evitabili).*

Personale coinvolto e funzioni
In ogni focolaio l'equipe è composta da almeno:
1) 1 Veterinario Ufficiale per il coordinamento delle operazioni di abbattimento e rilascio delle certificazioni necessarie;
2) 2 Tecnici di Prevenzione: a supporto del Veterinario Ufficiale per le operazioni di cui al punto precedente e per il controllo della corretta erogazione di anidride carbonica;
3) 2 abbattitori, 1 ruspista e altro personale dell'allevamento (3/4) per la movimentazione degli animali *(il personale indicato è soggetto a variazioni in funzione della tipologia di allevamento/struttura e numero di "campi di morte" organizzati)*

Operazioni di abbattimento
1) I suini vengono convogliati all'esterno dei ricoveri tramite corridoi, costituiti da transenne, nei cosiddetti "campi di morte" esclusivamente su platea cementata /terreno coibentato.
2) Successivamente gli animali vengono storditi mediante elettronarcosi; gli animali più pesanti di 30/35 Kg anche con pistola a proiettile captivo.
3) Di seguito caricati sul cassone del mezzo di trasporto mediante pala meccanica o altro mezzo idoneo.
4) Contemporaneamente alle operazioni di carico degli animali viene insufflata anidride carbonica nel cassone fino ad ottenere una saturazione di gas per un tempo di almeno 20 minuti dopo la chiusura.
5) Il cassone scarrabile / automezzo viene piombato, pesato, disinfettato ed inviato alla ditta di rendering* (secondo un percorso prestabilito concordato con il vet.uff.)
Ogni singolo trasporto dovrà essere scortato da certificato veterinario di autorizzazione al trasporto di animali morti che riporti il n° dell'ordinanza di il n° identificativo dei container e il peso** degli animali (reg. CE 1774/2002).

6) Dell'invio degli animali abbattuti dovrà essere data comunicazione al Servizio veterinario sede dell'impianto di trattamento a cura del Distretto veterinario inviante.
* Disinfettanti: Aldeide glutarica concentrazione del 2% di sostanza attiva Tempo di contatto di 5 minuti (o altro disinfettante di analoga efficacia)
- Le operazioni vengono eseguite direttamente a cura del servizio disinfezione dell'ASL.
** Il peso potrà anche essere rilevato al momento dello scarico presso la ditta di rendering a cura del ricevente Vet. ufficiale

Discussione e Conclusioni

Come brevemente illustrato l'estinzione di uno o piu focolai è particolarmente complessa e onerosa. E' necessario perciò disporre di una organizzazione ben collaudata che coinvolge non solo il personale veterinario ma anche quello tecnico e amministrativo sia presso i servizi centrali che sul territorio presso i distretti.
Tutte le operazioni devono svolgersi in progressione seguendo uno schema logico semplice e condiviso. Ogni componente deve avere chiarezza di *"chi fa che cosa"*. Si è di fronte ad una situazione di emergenza con molteplici richieste da più parti, proprio per questo, è necessario non sprecare tempo e risorse che in queste circostanze sono sempre i fattori limitanti a cui bisogna porre maggiore attenzione.
Altri elementi caratterizzanti sono:
la distruzione dei prodotti contaminati (o non distruzione di quelli non esposti e quindi non contaminati);
la pulizia e disinfezione degli allevamenti;
la decontaminazione dei reflui che in molti casi sono volumi enormi (migliaia di MC);
(il virus della malattia vescicolare del suino può sopravvivere al di fuori del corpo, anche nelle carni fresche, è estremamente resistente ai normali disinfettanti e ha la proprietà di essere persistente, è stabile in presenza di un pH compreso tra 2,5 e 12).
Ogni allevamento ha proprie caratteristiche (edifici, aree di stoccaggio dei prodotti / mangimi, fosse di raccolta sia sottogrigliato che esterne) che richiedono un approccio specifico e adeguato rispetto alla situazione che si presenta. Altro aspetto è il ripopolamento delle aziende con gli animali sentinella: tipologia di spazi presenti e tempo di permanenza sono gli elementi da valutare per indicare un numero e un percorso adeguato.
Ultimo aspetto sono le procedure per gli indennizzi. Non è possibile istruire correttamente una pratica di indennizzo nel rispetto della normativa, in tempi rapidi ed evitando tensioni o controversie legali se non si è proceduto con metodo fin dal momento del sospetto del focolaio (censimento!). Pare opportuno in questa sede una riflessione: la norma vigente prevede condizioni di indennizzo favorevoli. In particolare l'utilizzo delle quotazioni riportate sui bollettini nazionali ISMEA pubblicati ad hoc, ai sensi della Legge n.218/88, sono sempre superiori ai prezzi di mercato, oltre alla compensazione IVA (se dovuta). Inoltre non esistono le condizioni per modulare l'indennizzo che può essere corrisposto solo in ragione del 100%. Tale condizione è sfavorevole, atteso che il verificarsi di una malattia non può mai essere considerato una condizione favorevole, anche se ai soli fini economici. A questa situazione consegue che gli allevatori più danneggiati sono quelli vicini ai focolai, siti nelle zone di protezione, soprat-

tutto nel caso che il fermo aziendale superi i 30 gg. Si ritiene prioritario poter intervenire modulando l'indennizzo agli allevamenti colpiti ed incentivando forme assicurative compensatorie (a carico dell'allevatore).
In conclusione la presenza della malattia in una realtà zootecnica intensiva deve far riflettere al fine di apportare gli opportuni correttivi. E' indispensabile un nuovo approccio alla malattia, da un lato rimodulando gli interventi della sorveglianza epidemiologica, dall'altro ridurre il carico biologico (n. totale di suini/ Km^2) anche incentivando riconversioni produttive nel rispetto di distanze tra allevamenti, con particolare riguardo agli investimenti finalizzati all'obiettivo di rafforzare condizioni strutturali e gestionali di biosicurezza. Per ciascuna struttura è ormai indispensabile stimare lo specifico "rischio sanitario" sulla scorta di indicatori a ciascuno dei quali viene attribuito un peso specifico. La somma dei pesi andrà a posizionare l'impianto considerato in una scala predeterminata di valori collegati a specifici livelli di rischio.
E' fondamentale che gli allevatori comprendano l'importanza di quelle attività il cui scopo è quello di prevenire l'introduzione di agenti di malattia in una determinata area o allevamento. Le misure di biosicurezza (gestionali e strutturali) sono pertanto il cardine degli interventi necessari per realizzare una efficace difesa sanitaria degli allevamenti.

Un particolare ringraziamento a tutto il personale veterinario tecnico amministrativo coinvolto presso:
- ASL di Brescia - www.aslbrescia.it
- Unità Organizzativa Veterinaria della Regione Lombardia - www.sanita.regione.lombardia.it
- IZSLER sede di Brescia - www.bs.izs.it
- Osservatorio Epidemiologico Vet. Reg. (O.E.V.R.) della Lombardia - www.oevr.org

Bibliografia

- Direttiva 92/119 CEE del Consiglio del 17 dicembre 1992: che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie nonchè misure specifiche per la malattia vescicolare dei suini.
- Decisione 2005/779/CE della Commissione del 8 novembre 2005: relativa a talune misure sanitarie di protezione contro la malattia vescicolare dei suini in Italia e successive modifiche.
- DPR 362/96 del 17 maggio 1996: regolamento recante norme per l'attuazione della direttiva 92/119/CEE, del Consiglio del 17 dicembre 1992, che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie degli animali, nonchè misure per la malattia vescicolare dei suini.
- OM 26 luglio 2001: piano nazionale di eradicazione e sorveglianza della Malattia Vescicolare e sorveglianza della Peste Suina Classica.
- Piano di emergenza per la malattia vescicolare del suino del Centro di referenza di Brescia (scaricabile dal sito del CERVES - modulistica)
- Manuale di emergenza in caso di influenza aviaria (versione 1.1 www.izsvenezie.it)
- Linee guida per la gestione delle emergenze epidemiche e non epidemiche dei Dipartimenti di Prevenzione Veterinari
- Decreto D.G.S. Regione Lombardia N. 9008 del 06/08/2007

MALATTIA VESCICOLARE E MISURE DI BIO-SICUREZZA: FATTORI DI RISCHIO EVIDENZIATI NEI FOCOLAI LOMBARDI NEL 2006-2007

SWINE VESCICULAR DISEASE AND BIO-SECURITY MEASURES: RISK FACTORS IN 2006- 2007 OUTBREAKS IN LOMBARDIA

ALBORALI L.[1], ABRAMI S.[3], ZANARDI G.[1], AVISANI D., BELLINI S.[1]
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia; [3] Servizio Veteterinario ASL Brescia.

Parole chiave: Malattia vescicolare del suino, fattori di rischio, bio-sicurezza.
Key words: Swine Vesicular Disease, Risk factors, Bio-Security.

Riassunto. Si descrive la situazione epidemiologica della Malattia Vescicolare del Suino (MVS) verificatasi nell'Italia settentrionale nel periodo novembre 2006-dicembre 2007 con particolare riferimento agli episodi che hanno coinvolto le Province di Brescia, Mantova e Cremona in Lombardia.. Questi recenti focolai sono stati caratterizzati da una rapida diffusione del virus tra gli allevamenti e ciò può essere messo in relazione all'aumento della concentrazione dei suini nei comuni interessati dalla zona di protezione dove gli allevamenti sono aumentati, in undici anni, da 73 a 121. Ciò ha comportato, oltre ad una maggior densità per area, ad una riduzione delle distanze tra gli allevamenti, fattore rivelatosi fondamentale nel secondo periodo epidemico considerando che il 76 % delle aziende ha avuto nella contiguità tra gli allevamenti il principale fattori di rischio. Ai fini del presente lavoro, si sono prese in considerazione le seguenti informazioni: l'evoluzione della concentrazione degli allevamenti nei comuni interessati dalla zona di protezione, le modalità di introduzione e diffusione dell'infezione, le carenze nelle misure di bio-sicurezza.
In base ai fattori di rischio evidenziati (introduzione di suini, mezzi di trasporto in azienda, eliminazione degli scarti e dei morti, contiguità con altri focolai e vicinanza con terreni in cui sono stati distribuiti liquami) si è verificata la carenza nell'applicazione della misure di bio sicurezza al fine di evitare il rischio della introduzione negli allevamenti del virus della MVS.

Abstract. Authors describe the epidemiological features of the SVD outbreaks occurred in Lombardia during the 2006 epidemic, the main attention is focalized on the outbreaks of Brescia and Mantova provinces. The 2006 2007 epidemic were characterized by high diffusion of virus between herds. This is related to high concentration of swine herds in protection area where farms from 73 became 121 during period 1996-2007. In the second period of epidemic the reduce of area between herds were the main risk factor for introduction of SVD in 76 %of outbreaks.
For the purpose of this paper the following information are taken into account: herds evolution in protection area, risk factors for the introduction and spread of the infection, weakness of the bio security measures applied.

On the basis of the risk factors highlighted in the outbreaks (movement of pigs, introduction of contaminated haulier's vehicles for different purpose, proximity to other outbreaks, use of manure on agricultural land as fertilizer) bio security measures were realized to minimize the risk of SVD introduction and spread.

INTRODUZIONE

In Italia, dal 1995, è in corso un Piano di sorveglianza che ha per obiettivo la eradicazione della Malattia Vescicolare del Suino (MVS) tramite l'accreditamento delle aziende e delle Regioni.

Le Regioni del centro nord hanno acquisito l'accreditamento dal 1997, accreditamento che non è stato ancora raggiunto da alcune Regioni dell'Italia meridionale.

In questi ultimi anni, anche nelle Regioni accreditate, si sono verificati focolai della malattia che sono stati rapidamente estinti. Nel 2006 si è verificata una recrudescenza della patologia che ha coinvolto le Regioni settentrionali negli ultimi mesi dell'anno mentre nei primi mesi l'andamento della malattia era in linea con quello dell'anno precedente ed i focolai erano segnalati nelle Regioni non accreditate. Il picco epidemico si è verificato negli ultimi mesi dell'anno, quando la malattia è stata diagnosticata e si è diffusa in alcune regioni dell'Italia settentrionale; tra queste la maggiormente interessata è risultata la Lombardia, dove tra il novembre 2006 e il gennaio 2007 sono stati notificati 36 focolai che hanno interessato le province di Brescia (20 focolai), Mantova (10 focolai), Bergamo (2 focolai), Milano (2 focolai), Lodi (1 focolaio), Sondrio (1 focolaio). Complessivamente sono stati abbattuti 92.219 capi.

Successivamente si è verificato un secondo periodo epidemico che ha portato all'individuazione di 17 focolai e 4 aziende sieropositive nei mesi compresi tra maggio e ottobre 2007. Sono state interessate dai focolai le province di Cremona (4), Brescia (12), Bergamo (1). Solo un focolaio è stato individuato al macello e all'esterno dell'area sopraccitata in provincia di Bergamo. L'elevata densità di suini della provincia di Brescia, la comparsa della malattia in due aziende già focolaio nel primo periodo e il coinvolgimento di aziende con riconosciute misure di bio-sicurezza hanno indotto ad adottare un intervento straordinario di depopolamento dell'area considerata a rischio.Il provvedimento ha comportato l'abbattimento di 44.205 capi appartenenti a 15 allevamenti. I controlli eseguiti successivamente rispettando le modalità e la tempistica previste dalla normativa UE hanno dato esito favorevole tanto che il 14 gennaio 2008 sono stati revocati i provvedimenti restrittivi in precedenza applicati.

Le recenti due epidemie nel periodo 2006-2007 sono state caratterizzate da una evidente e rapida diffusione dell'infezione non evidenziata negli episodi riscontrati in Lombardia negli anni precedenti 1988, 1999 e 2002 (2,3). Ciò aveva fatto prendere in considerazione anche l'ipotesi che, negli anni, l'agente eziologico virale potesse aver subito nella sua azione patogenetica variazioni tali da comportare modifiche delle manifestazioni cliniche e epidemiologiche. In realtà si è riconosciuto che l'epidemiologia e le relative modalità di controllo sono fortemente condizionate dalle caratteristiche di resistenza del virus nelle feci e nell'ambiente. Il virus diffonde all'interno di una

azienda con il contatto tra animali sensibili e infetti oppure anche con il contatto con l'ambiente contaminato. Diverse sono le modalità di diffusione del virus tra le aziende che per lo più sono da ricondursi all'introduzione di suini infetti, veicoli o attrezzature contaminati o personale. In assenza di spostamento di suini infetti o di materiali contaminati anche all'interno di una stessa azienda la MVS tende a non diffondere da un reparto all'altro tanto che può essere considerata malattia di reparto più che di azienda (1).
Nelle recenti epidemie si è osservata una rapida diffusione dell'infezione fra aziende simile a quella riscontrata tra diversi settori di alcuni focolai. Ciò può essere riferito al fatto che, in questi ultimi anni, si è introdotto il nuovo metodo di allevamento "multisito" che ha comportato la notevole frammentazione del ciclo produttivo e riproduttivo della stessa azienda in tre o quattro multisiti a determinate distanze uno dall'altro. A tale evoluzione ha fatto seguito un notevole aumento delle movimentazioni degli animali, senza che fosse affiancato da un adeguamento delle principali misure di bio - sicurezza.
Con il presente lavoro si vuole approfondire l'analisi dei principali fattori di rischio che hanno condizionato l'insorgenza della malattia e la diffusione rapida tra le aziende nei due periodi epidemici, evidenziando l'evoluzione dell'allevamento suino nella zona sede dei focolai e le carenze riscontrate nell'applicazione delle principali misure di bio-sicurezza.

MATERIALI E METODI

Si è paragonato l'allevamento suino degli anni '90 con l'attuale, con particolare riferimento alla provincia di Brescia e alla zona interessata dagli ultimi focolai di MVS.. Sono state considerate le principali variazioni che hanno interessato l'allevamento in termini di patrimonio, di tipologia aziendale e di densità per Km^2.

Fattori di rischio
Tutte le aziende sede di focolaio nei due periodi epidemici considerati sono state sottoposte a visita clinica ed indagine epidemiologica da veterinari delle ASL e dell'Istituto Zooprofilattico competente per territorio.
Nelle aziende "sospette" (correlazione epidemiologica con focolaio, sieropositività, presenza di sintomatologia clinica) è stata effettuata la visita clinica seguita dal prelievo dei campioni previsti per gli esami di laboratorio di conferma. Nel caso in cui venisse sospettata o confermata la presenza della MVS si effettuava l'indagine epidemiologica, utilizzando il modello di indagine allegata all'OM 26 Luglio 2001: "indagine epidemiologia per malattia vescicolare e peste suina classica".
Sulla base delle informazioni al momento della visita clinica e dell'indagine sono stati definiti i principali fattori di rischio. Nelle aziende sede di focolai sono state considerate le seguenti operazioni a rischio:
– introduzione in azienda di animali con stato sanitario non noto per MVS,
– carico di suini, riproduttori, riformati e scarti,

– carico carcasse,
– entrata in azienda di veicoli,
– distribuzione liquami per fertirrigazione in terreni limitrofi,
– entrata/uscita persone, personale che lavora in più aziende.

Misure di bio-sicurezza
Ai fini della valutazione delle misure di bio-sicurezza nelle aziende in cui erano presenti i riproduttori si sono considerati i requisiti strutturali dell'allevamento, le modalità gestionale dell'azienda, i mezzi di trasporto e il personale. In totale si sono prese in considerazione 15 e 9 aziende sede di focolaio rispettivamente nel primo e nel secondo periodo epidemico.
Per quanto riguarda le strutture sono stati presi come riferimento: parcheggio o area fuori dal perimetro dell'allevamento per la sosta dei veicoli del personale e/o visitatori, barriere quali cancelli, sbarre, muri di cinta ecc.., locali adibiti a spogliatoio.
La quarantena era considerata un locale fisicamente separato, funzionalmente e gestionalmente dove venivano osservati clinicamente e controllati i riproduttori di nuova introduzione.
Nella valutazione dei mezzi di trasporto sono state considerate la piazzola per la pulizia e disinfezione con apparecchiature a pressione per la pulizia e disinfettanti di provata efficacia nei confronti del virus della MVS, la documentazione della disinfezione degli automezzi su appositi registri e la modalità di circolazione degli automezzi.
In merito alla movimentazione degli animali sono stati considerati il carico/scarico dei suini vivi, degli scarti e dei morti. E' stato valutato se il carico/scarico dei suini vivi era eseguito all'esterno dell'area di pertinenza dell'allevamento (rampa carico/scarico perimetrale), oppure effettuato all'interno dell'allevamento a condizione che vi fosse il mono-carico e il veicolo fosse pulito e disinfettato con disinfettati attivi per il virus MVS prima del carico degli animali.
La valutazione del carico degli scarti prevedeva fosse eseguito all'esterno dell'area di pertinenza dell'allevamento (rampa carico/scarico perimetrale), oppure che gli scarti fossero portati all'esterno con mezzo aziendale senza che l'automezzo per il ritiro degli scarti entrasse in allevamento. Anche le osservazioni del carico dei suini morti riguardavano lo stoccaggio in attesa dello smaltimento in cella frigorifero preferibilmente con doppio accesso, uno dei quali con uscita sull'esterno dell'allevamento oppure il trasporto all'esterno degli animali morti con mezzo aziendale senza che l'automezzo entrasse in allevamento.

RISULTATI

Il patrimonio suinicolo della Lombardia è passato da circa 3 milioni di capi nel 1995 (ati ISTAT 1997) a circa 4,5 milioni nel 2007 (Anagrafe Regione Lombardia) con un aumento della densità di suini per Km^2 da 120,7 a 186,6 . Dal 1996 al 2007 il numero delle aziende suine controllate per MVS è aumentato di oltre il 50%. In regione gli

allevamenti sono aumentati da 1800 a 3078, nella provincia di Brescia da 507 a 900, nel distretto di Orzinuovi da 93 a 150 e nel comune di San Paolo da 11 a 17.
L'evoluzione dell'allevamento suino non è stato simile in tutte le regioni a vocazione zootecnica. In Emilia Romagna nel 1998 erano censiti 3.943 allevamenti per una presenza di 1.560.806 capi. Le maggiori densità dei suini (superiore ai 150 capi per Kmq) erano quelle di Modena e Reggio Emilia, seguite da Ravenna (73 suini/Kmq) e Forlì (68 suini/Kmq)(dati CRPA). Nel 2000 erano presenti 3.395 aziende in cui erano allevati 1.403 200 capi mentre nel 2006, considerando anche aziende di piccole dimensioni (1-9 capi), sono state censite 3 815 aziende per un totale di capi allevati di 1 296 923. Dal 2000 al 2006 si è assistito ad un apparente incremento del 12 % delle aziende e ad una reale diminuzione dell'8% dei capi (dati CEREV).
Se si prende come riferimento la zona che maggiormente si è dimostrata problematica per la diffusione della MVS ci si rende subito conto dell' elevata densità di suini che la caratterizza.
Il distretto di Orzinuovi è un area ad elevata densità di suini (oltre 1400 / km^2) e tra i comuni maggiormente interessati c'è quello di San Paolo che ha una superficie di 18 Km^2 in cui sono allevati 54 000 suini in 17 aziende, con una densità di circa 3000/ km^2.
Prendiamo in considerazione l'intera area problema cioè la zona di protezione degli ultimi sei focolai comparsi in poco più di un mese ed in seguito sede delle operazioni di depopolamento. Tale zona ha interessato 6 comuni e precisamente i comuni di Orzinuovi, Orzivecchi, Borgo San Giacomo, Pompiano, Quinzano d'Oglio e San Paolo. Nella Tabella 1 e nella Figura 1 sono evidenziate la distribuzione dei 73 e 121 allevamenti presenti in questi comuni rispettivamente nel 1996 e nel 2008.

Tab 1. Allevamenti presenti nei 6 comuni coinvolti nel territorio della zona di protezione riferiti al 1996 e al 2007
Tab 1. *Herds in 6 villages in protection area in 1996 and 2007*

Comune	1996	2007
Orzinuovi	33	47
Orzivecchi	8	13
Borgo San Giacomo	10	16
Pompiano	3	10
Quinzano d'Oglio	8	18
San Paolo	11	17
Totale	73	121

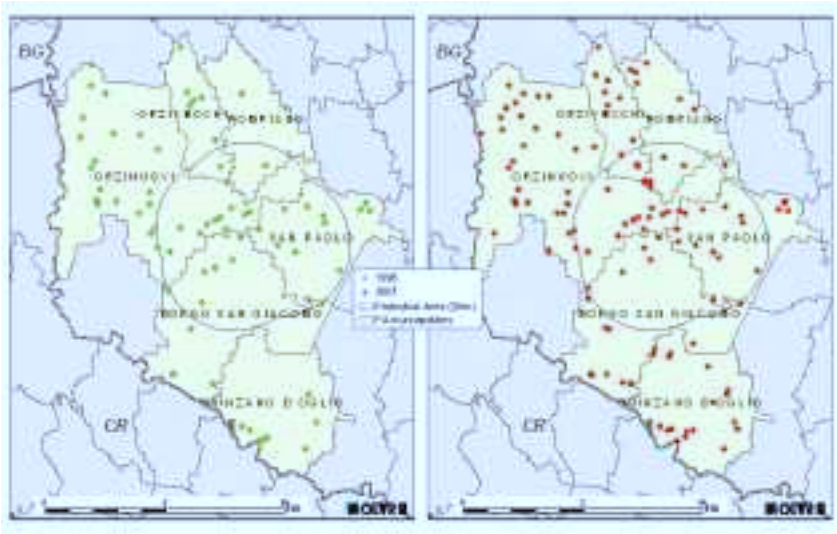


Fig. 1. Distribuzione degli allevamenti riferita al 1996 e 2007 nei 6 comuni interessati dalla zona di protezione degli ultimi focolai 2007
Fig. 1. *Herds distribution in 1996 and 2007 in 6 villages in protection area of last 2007 outbreaks.*

In particolare nella zona di protezione degli ultimi 6 focolai, in vigor al momento della decisione dell'operazione di depopolamento, erano presenti 39 allevamenti contro i 26 del 1996. Nella Figura 2 si può osservare la distribuzione degli allevamenti e dei focolai nella zona dei 3 Km in contrasto con la situazione del medesimo territorio 11 anni prima.

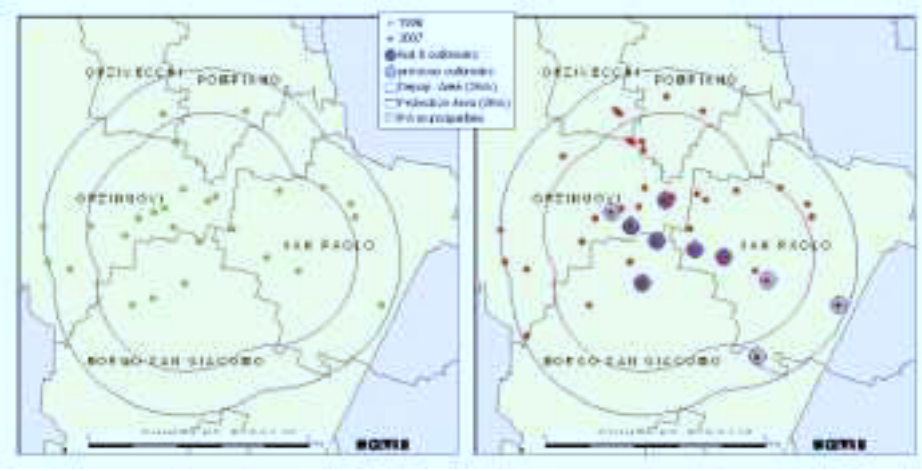


Fig. 2. Distribuzione degli allevamenti e dei focolai nella zona dei 3 Km nel 2007 e distribuzione degli allevamenti nel 1996 nel territorio della recente zona di protezione
Fig. 2. *Herds and outbreaks distribution in 3Km area in 2007 and herds distribution in 1996 in same protection area*

Fattori di rischio e misure di bio-sicurezza carenti rilevate nelle aziende sede di focolaio nel periodo novembre 2006 -gennaio 2007.

Dai risultati delle indagini epidemiologiche effettuate è stato possibile individuare l'origine dell'infezione delle aziende focolaio in 32 allevamenti su 36 (88,9 %) ed è stata messa in relazione a:

– introduzione in aziende di suini provenienti da aziende focolaio (15)

–introduzione in azienda di veicoli contaminati (12)

–Entrata in azienda di personale contaminato (veterinari, fecondatori, operai) (6)

–Contiguità con aziende sede in focolaio (10). In 6 focolai è risultato che i campi contigui ai locali di stabulazione degli animali, venivano fertirrigati con liquame proveniente da aziende a loro volta sede di focolaio.

Nella Tabella 2 sono riportate le misure di bio-sicurezza risultate carenti nelle 15 aziende sede di focolaio in cui erano presenti i riproduttori.

Tab 2. Misure di bio-sicurezza risultate carenti nelle 15 aziende focolaio con riproduttori
Tab 2. *Weakness of the bio security measures applied in 15 outbreaks sow farm*

Tipologia	Numero aziende	Strutture	Quarantena	Mezzi	Mov. suini	Mov. Scarti	Mov. morti
Ciclo chiuso	2	1		2	2	1	1
Ciclo aperto	10	8	1	10	3	8	3
Sito 1	3	1		3	2	1	1
totale	15	10	1	15	7	10	5

Nella Tabella 3 sono riportati i principali fattori di rischio riscontrati nelle 36 aziende focolaio. In ciascun focolaio potevano essere presenti uno o più fattori di rischio e una o più delle misure di bio-sicurezza risultate carenti (4).

Tab 3. Fattori di rischio rilevati nelle 36 aziende focolaio.
Tab 3. *Risk factors in 36 outbreaks.*

Tipologia	introduzione suini	carico suini, scarti e riproduttori riformati	carico carcasse	contiguità altri focolai	liquami	persone
C.chiuso		+				
C.chiuso		+				
C.aperto		+				
C.aperto		+				
C.aperto						+
C.aperto				+	+	
C.aperto	+					
C.aperto				+	+	+
C.aperto				+	+	
C.aperto				+		
C.aperto			+			+
C.aperto	+					
Sito 1		+				
Sito 1		+			+	+
Sito 1		+	+	+		
Ingrasso	+					
Ingrasso		+				
Ingrasso		+				
Ingrasso	+					
Ingrasso	+					
Ingrasso			+	+		
Ingrasso		+				
Ingrasso				+	+	+
Ingrasso	+					
Ingrasso				+		
Ingrasso	+					
Ingrasso				+		+
Sito 2						+
Sito 3	+					
Sito 3	+					
Sito 3	+					
Sito 3	+					
Sito 3	+					
Stalla sosta	+					
Stalla sosta	+					
Stalla sosta	+					
Totale	15/36	9/36	3/36	10/36	6/36	6/36
%	44	22	8	27	17	17

Fattori di rischio e misure di bio-sicurezza nelle aziende sede di focolaio da maggio a ottobre 2007

E' stato possibile individuare nella contiguità ad altri focolai il principale fattore di rischio. I fattori di rischio rilevati sono stati:

– introduzione in aziende di suini provenienti da aziende sede di focolaio (4)
– introduzione in azienda di veicoli contaminati (6)
– Entrata in azienda di personale contaminato (veterinari, fecondatori, operai) (4)
– Contiguità con aziende sede in focolaio (13).

Nella Tabella 4 sono riportate le misure di bio-sicurezza risultate carenti nelle 9 aziende focolaio in cui erano presenti i riproduttori.

Tab 4. Misure di bio-sicurezza risultate carenti nelle 9 aziende focolaio con riproduttori
Tab 4. *Weakness of the bio security measures applied in 9 outbreaks sow farm*

Tipologia	Numero aziende	Strutture	Quarantena	Mezzi	Mov. suini	Mov. Scarti	Mov. morti
Ciclo chiuso	1	1		1	1	1	1
Ciclo aperto	6	2	3	6	3	5	4
Sito 1	2	1		2	1	1	1
totale	9	4	3	9	5	7	6

Nella Tabella 5 sono riportati i principali fattori di rischio riscontrati nelle 17 aziende sede di focolaio tenendo conto che potevano essere presenti più fattori di rischio o più misure di bio-sicurezza carenti.

Tab 5. Fattori di rischio rilevati nelle 17 aziende focolaio.
Tab 5. *Risk factors in 17 outbreaks.*

Tipologia	introduzione suini	carico suini, scarti e riproduttori riformati	carico carcasse	contiguità altri focolai	liquami	persone
C.chiuso				+		+
C.aperto		+	+			
C.aperto	+			+		
C.aperto				+		
C.aperto				+	+	
C.aperto	+			+	+	
C.aperto				+		+
Sito 1				+		
Sito 1				+		+
Ingrasso	+			+	+	
Ingrasso				±		
Ingrasso				+		+
Ingrasso				+		
Ingrasso				+		
Ingrasso			+	+		
Ingrasso		+	+			
Stalla sosta	+					
Totale	4/17	2/17	4/17	13/17	3/17	4/17
%	23	12	23	76	18	23

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La rapidità di diffusione del virus della MVS tra allevamenti può essere messo in relazione ai cambiamenti dell'allevamento suino nell'area sede dei focolai e alla scarsa applicazione di adeguate misure di bio-sicurezza. Nel territorio compreso nei 6 comuni

citati si è verificato un aumento delle aziende e del numero dei capi allevati per superficie ed una conseguente frammentazione del ciclo produttivo con incremento delle movimentazioni degli animali. Nei comuni interessati dalla zona di protezione il numero degli allevamenti è passato da 73 a 121 in 11 anni. Questo fatto ha comportato oltre ad una maggior densità di suini per area una riduzione delle distanze tra allevamenti, fattore rivelatosi fondamentale nel 2° periodo epidemico considerato che il 76 % delle aziende ha avuto nella contiguità ad altri focolai il principale fattori di rischio. Ai cambiamenti apportati al sistema di gestione degli allevamenti per migliorare le problematiche sanitarie aziendali non ha fatto seguito l'applicazione di adeguate misure di bio-sicurezza.. Basti pensare che in tutte le aziende con riproduttori risultate sede di focolaio sono risultate carenti ed insufficienti le misure di bio-sicurezza adottate per contenere il rischio legato alla circolazione dei mezzi di trasporto in allevamento.

Implementare, potenziare ed adeguare le misure di bio-sicurezza al fine di contenere la trasmissione di patogeni tra allevamenti rappresenta oggi una necessità fondamentale anche per continuare a usufruire degli indiscutibili vantaggi gestionali e sanitari apportati dal nuovo sistema di allevamento "multisito".

Quanto accaduto per la MVS in Lombardia deve far riflettere sul grave rischio che può correre il settore suinicolo quando in aree ad elevata densità viene introdotta una malattia infettiva e diffusiva senza che si possano mettere in atto rigide ed adeguate misure di contenimento. Non dobbiamo dimenticare che gli scenari avrebbero potuto essere assai più catastrofici se invece della MVS fosse stata introdotta una malattia a diffusibilità più elevata.

BIBLIOGRAFIA

1. Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G.L., Burrow R., Goodridge D., Brown F. & Cartwright B.
2. Zanardi G. PhD Thesis on "Malattia Vescicolare del Suino da enterovirus: considerazioni epidemiologiche in seguito ai focolai verificatisi in Lombardia nel 1998/99", 1999.
3. Zanardi G., Bellini S., Tranquillo V.M., Avisani D. & Bonacina C.Epidemiogical features of Swine Vesicular Disease (SVD) outbreaks Lombardy region (Italy) in 2002. X Simposio della Società Internazionale di Epidemiologia e Economia Veterinaria (ISVEE), Vina del Mar (Chile) 17-21 Novembre 2003.
4. Bellini S., Abrami S, Cominardi F., Nigrelli A., Zanardi G.,Brocchi E.,Alborali L. Malattia vescicolare del suino: analisi dei fattori di rischio evidenziati nei focolai lombardi al fine della predisposizione di misure di bio-sicurezza, XXXIII Atti Siapas 2007, 213-223.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

INDAGINE SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI E RILIEVO DEI GENI CODIFICANTI PER L'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* ISOLATI IN ITALIA

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND DETECTION OF RESISTANCE GENES OF STREPTOCOCCUS SUIS *STRAINS ISOLATED IN ITALY*

BAROCCI S.; CIUTI F.; CUCCO L.; D'ANGELO, G.; DETTORI, A.; PANICCIÀ M.; SABBATINI M.; MAGISTRALI C.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia.

Parole chiave: *Streptococcus suis*, suino, antibiotico-resistenza
Key words: *Streptococcus suis*, swine, antibiotic-resistance

Riassunto. le infezioni da *Streptococcus suis* sono considerate uno dei principali problemi di origine batterica negli allevamenti intensivi. Numerosi autori hanno segnalato un elevato livello di resistenze di questo microrganismo ad alcuni antimicrobici, quali le tetracicline, i lincosamidi ed i macrolidi. Scopo di questo lavoro è stato valutare la antibiotico-sensibilità di ceppi di *S. suis* (n=63) isolati in Italia centro-settentrionale dal 2003 al 2007 . L'indagine è stata condotta tramite valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) in base a quanto raccomandato dalle norme CLSI M31-A2. Successivamente, su 36 isolati, è stato condotto un test in PCR per il rilievo dei geni codificanti per la resistenza a macrolidi e tetracicline, confermando elevati livelli di resistenza a questi antimicrobici.
Abstract. *Streptococcus suis* infections are considered a major problem in the swine industry and an emerging disease in humans. Different authors reported a high degree of resistance of this organism to some antimicrobials such as tetracyclines, lincosamides and macrolids. The purpose of this study was to evaluate antimicrobial susceptibility of *S.suis* strains (n=63), isolated from swine in central and northern Italy from 2003 to 2007. The investigation was carried out using a microbroth dilution method according CLSI M31-A2. 36 isolates were also tested for detection of macrolides and tetracyclines resistance genes by a PCR assay, confirming the presence of a high degree of resistance to these antimicrobials.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Streptococcus suis* è considerata uno dei principali problemi sanitari dei del suino allevato in modo intensivo, causando la comparsa di meningiti, ma anche di artriti, endocarditi e setticemie. Anche se *S.suis* è considerato principalmente un patogeno del suino, da circa 30 anni ne è riconosciuto un ruolo quale agente di zoonosi di tipo professionale. Si ritiene che nell'uomo l'infezione da *S.suis* sia probabilmente sotto stimata, come confermato dall'aumento di segnalazioni in seguito alla comparsa nel 2005 in Cina di episodi a carattere epidemico (Gottschalk, 2007). Recentemente è stato

riscontrato un caso di meningite umana da *S.suis* a Pordenone (Camporese, 2007). Poiché sia nell'uomo che nella specie suina, il trattamento con antimicrobici appare il fattore chiave per il controllo della malattia, e considerata la notevole pressione selettiva a cui il batterio è sottoposto nei moderni allevamenti intensivi, la sorveglianza sulla insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza in *S.suis* appare importante. Isolati dall'uomo e da animali infetti risultano frequentemente resistenti a macrolidi, lincosamidi e tetracicline (Wisselink, 2006). Scopo di questo lavoro è stato valutare la sensibilità agli antimicrobici in ceppi di *Streptococcus suis* isolati in Italia centrale e settentrionale da suini che presentavano forme clinicamente manifeste di streptococcosi. In secondo luogo, si è svolta una indagine per valutare la presenza dei geni codificanti per le più comuni resistenze riscontrate.

Materiali e metodi

I ceppi (n=63) esaminati sono stati isolati mediante tecniche di batteriologia tradizionale da cervello, milza, polmone di suini affetti da streptococcosi, isolati dal 2003 al 2007 in Italia centrale e settentrionale. La caratterizzazione di specie è stata effettuata mediante sistema ID32Strep (Biomerieux). I ceppi sono stati conservati mediante liofilizzazione o congelati. Gli isolati sono stati esaminati mediante metodo di microdiluizione in piastra utilizzando piastre disponibili in commercio (codice: BOPO6F, Trek Diagnostic Systems), secondo quanto indicato dalle norme CLSI (ex NCCLS) M31-A2. Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: penicillina (P), concentrazioni da <0.12 µg/ml a 8 µg/ml; ampicillina (Amp), concentrazioni da 0.25 µg/ml a 16 µg/ml; ceftiofur (TIO) da <0.25 µg/ml a 8 µg/ml; gentamicina (Gen), da 1 µg/ml a 16 µg/ml; enrofloxacin (Enro) da <0.12 µg/ml a 2 µg/ml; florfenicolo (Flor) da 0.25 µg/ml a 8 µg/ml; neomicina (Neo) da 4 µg/ml a 32 µg/ml; clindamicina (Cli) da 0.25 µg/ml a 16 µg/ml; spectinomicina (Spe) da 8 µg/ml a 64 µg/ml; clortetraciclina (ClT) da 0.5 µg/ml a 8 µg/ml; ossitetraciclina (OT) da0.5 µg/ml a 8 µg/ml; tilosina (Tyl) da 0.5 µg/ml a 32 µg/ml; tilmicosina (Til) da 0.5 µg/ml a 64 µg/ml. I limiti di sensibilità relativi a ciascun antibiotico sono stati interpretati in base a quanto indicato da Wisselink (2006) e Marie (2002).

PCR: L'esame in PCR è stato effettuato su 36 ceppi. Le resistenze batteriche, dal punto di vista genetico, sono state studiate seguendo le modifiche apportate alle metodiche di Aarestrup et al. (2000), per la ricerca dei geni *tet* (M)e *tet* (O), e di Martel et al. (2001), per la ricerca dei geni ermB e mefA/E. In breve, dopo l'estrazione di DNA da coltura su agar sangue tramite shock termico, per la ricerca di tetM, è stata allestita la seguente reazione da 25 µL (concentrazioni finali): MgCl2 (1,5 mM), Buffer GoTaq® 1X (Promega, WI, USA), dNTPs (0,1 mM), primers tetM1 e tetM2 (0,5 µM), GoTaq® (1 U) e 2 µL di DNA. Il protocollo di amplificazione utilizzato è il seguente: denaturazione iniziale a 94°C x 3'; 40 cicli a 94°C x 1', 45°C x 1', 72°C x 1'; estensione finale a 72°C x 10'. Anche per tetO la reazione è stata la stessa, ma con la temperatura di annealing impostata a 55°C. Gli ampliconi ottenuti risultano rispettivamente di 657 e 634 bp. Sia per ermB che per mefA/E, è stata allestita la seguente reazione da 25 µL

(concentrazioni finali): MgCl2 (1,5 mM), Buffer GoTaq® 1X, dNTPs (0,2 mM), primers ermBf e ermBr (2 µM), GoTaq® (1 U) e 2 µL di DNA. Il protocollo di amplificazione utilizzato è il seguente: denaturazione iniziale a 93°C x 3'; 35 cicli a 93°C x 1', 57°C x 1', 72°C x 1'; estensione finale a 72°C x 10'. Gli ampliconi ottenuti risultano rispettivamente di 639 e 346 bp. La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio al 2%. Per la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il bromuro di etidio (Sigma-Aldrich, MO, USA) e, come marker di peso molecolare, è stato scelto il Ladder 100 bp (New England BioLabs, MA, USA).

Risultati

In tabella 1 sono indicati i risultati della valutazione della minima concentrazione inibente mediante microdiluizione in piastra (MIC). I dati vengono forniti come numero dei ceppi che presentava una determinata MIC. Dati superiori od inferiori rispetto all'ultimo valore di MIC sono stati indicati unitamente al valore più vicino (ad esempio, i dati >64 µg/ml sono stati sommati ai dati di 64 µg/ml). In tabella, il limite di sensibilità, quando reperibile in bibliografia, viene visivamente indicato mediante una linea orizzontale.

Tab 1. Valori di minima concentrazione inibente (indicati i numeri di ceppi); le concentrazioni esaminate (µg/ml) per ciascun antimicrobico sono indicate con una x . La linea verticale indica il limite di sensibilità

	<0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
P	x57	x1	x3	x1	x	x	x	x2				
Amp			x60	x1	x	x2	x	x	x			
TIO			x63	x	x	x	x	x				
Gen					x1	x5	x28	x31	x			
Enro	x1	x	x10	x39	x10	x3						
Flor			x	x	x30	x33	x		x			
Neo							x3	x9	x38	x13		
Cli			x8	x	x1	x	x	x	x53			
Spe								x3	x54	x2	x1	3
ClT				x5	x	x	x4		x54			
OT				x5	x	x	x5		x53			
Tyl				x10	x	x	x		x	x	x53	
Til				x	x	x	x10	x		x	x	53

In Tabella 2 sono invece indicati i risultati ottenuti in seguito a caratterizzazione dei geni codificanti per l'antibiotico resistenza in parallelo con quelli derivanti dalla tipizzazione fenotipica degli antimicrobici interessati. I dati sono elencati per singolo stipite; sono inoltre evidenziati in grigio tutti i risultati in cui la caratterizzazione fenotipica e quella genotipica hanno fornito esiti discordanti.

La legenda relativa alle abbreviazioni degli antimicrobici è compresa nel testo.

Tab. 2. Esito dei risultati della tipizzazione fenotipica e genotipica per le resistenze a tetracicline, macrolidi e lincosamidi, indicati per isolato esaminato. Sono evidenziati i risultati discordanti.

ceppo	tet (O)	tet (M)	erm (B)	mefAE	ClT	OT	Tyl	Cli	Til
s24	neg	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
s25	neg	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
s26	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
s27	neg	neg	neg	neg	<0.5	<0.5	<0.5	1	<4
s28	neg	neg	pos	neg	4	2	<0.5	<0.25	<4
v100	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v101	pos	neg	pos	neg	>8	8	>32	>16	>64
v103	pos	neg	pos	neg	>8	8	>32	>16	>64
v104	neg	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v106	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v20	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v21	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v23	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v24	pos	neg	pos	neg	4	8	>32	>16	>64
v25	pos	neg	pos	neg	>8	8	>32	>16	>64
v26	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v27	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v28	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v29	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v3	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v31	pos	neg	pos	neg	8	>8	>32	>16	>64
v32	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v34	pos	neg	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v35	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v36	neg	neg	neg	neg	<0.5	<0.5	<0.5	<0.25	<4
v38	neg	neg	neg	neg	<0.5	<0.5	<0.5	<0.25	<4
v40	pos	pos	pos	neg	>8	>8	>32	>16	>64
v42	pos	neg	pos	neg	8	>8	>32	>16	>64
v54	pos	neg	pos	neg	4	4	>32	>16	>64
v73	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v75	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v76	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v92	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v96	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v97	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64
v99	pos	neg	pos	neg	8	8	>32	>16	>64

Discussione

I dati di minima concentrazione inibente mostrano tutti i ceppi sensibili a ampicillina, ceftiofur, florfenicolo e gentamicina, mentre due isolati sono risultati resistenti alla penicillina e tre ad enrofloxacin. Si conferma pertanto una generale sensibilità ai beta lattamici, mentre si è registrato un notevole numero di resistenze per lincosamidi, macrolidi e tetracicline. In particolare, l'84% e l'86% degli isolati è si è dimostrato resistente per ossitetraciciclina e clortetraciclina, rispettivamente, mentre l'84% era resistente a tilosina, tilmicosina e clindamicina. L'elevata resistenza a macrolidi/lincosamidi e tetracicline è già stata segnalata in Europa ed è probabilmente legata al diffu-

so impiego di tilosina e tetraciclina negli allevamenti intensivi (Marie, 2002). La cross resistenza verso macrolidi/ lincosamidi è codificata dai geni *erm*; in particolare il gene *erm* (B) è quello più comunemente presente in *Streptococcus* spp. Trattandosi di elementi genetici mobili, è stato ipotizzato che in rari casi, possa avvenire un trasferimento a ceppi di *Streptococcus* spp. umani (Martel, 2005). In base a quanto riportato in letteratura inoltre, il gene *tet* (O) è quello più comunemente coinvolto nella resistenza alle tetracicline in *S.suis*, seguito da *tet* (M) (Martel, 2001). La tipizzazione genotipica indica una percentuale di ceppi positivi a *tet* (O) o *tet* (M) dell'81%, percentuale che si avvicina a quella ottenuto fenotipicamente; *Tet* (M) si è rivelato inoltre un gene piuttosto raro, dal momento che era presente solo in un isolato, per altro già positivo per *tet* (O). In due casi si è osservata una negatività ai due geni *tet* con la presenza di valori di MIC superiori alla soglia di sensibilità, questa discordanza si può interpretare con il coinvolgimento di componenti genetiche diverse da quelle ricercate. In un altro caso, la positività a *tet* (O) non si è accompagnata a resistenza fenotipica, anche se i valori di MIC erano prossimi alla soglia di sensibilità. Per quanto riguarda le classi di macrolidi e lincosamidi, si può notare come che per l'80,6% dei casi ci sia perfetta corrispondenza fra caratteristica genotipica (per *erm* (B)) e fenotipica, dimostrando come *erm* (B) sia realmente il gene principalmente coinvolto in questo tipo di resistenza. Solo in un caso si è osservata positività ad *erm* (B) e assenza di resistenza fenotipica, interpretabile con una mancata espressione del gene. Tutti i ceppi sono risultati negativi a *mefA/E* confermando come si tratti di un gene piuttosto raro nel genere *Streptococcus*. In conclusione, il presente lavoro conferma l'elevata percentuale dei ceppi di *S.suis* resistenti alle classi di tetracicline e macrolidi/lincosamidi, e dimostra come tali resistenze siano dipendenti in larga parte da componenti genetiche mobili.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. Giuseppe Merialdi per avere fornito gli isolati provenienti dall' Italia settentrionale e la Schering Plough Animal Health per aver messo a disposizione le piastrine per la determinazione delle MIC.

Bibliografia

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. (2000) "Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark". Diagn Microbiol Infect Dis. 37:127-37.

Camporese A, Tizianel G, Bruschetta G, Cruciatti B, Pomes A. (2007) "Human meningitis caused by *Streptococcus suis*: the first case report from north-eastern Italy." Infez Med. 15:111-114.

CLSI (2002) M31-A2 "Performance standards for antimicrobial disk and susceptibility tests for bacteria isolate from animals". Second edition. Approved standard.

Gottschalk, M. (2007) "Lessons learned from China's *Streptococcus suis* outbreak: risk for

humans". In: Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, March 3-6 2007 Orlando, Florida: 377-380.

Marie J., Morvan H., Berthelot-Herault F., Sanders P., Kempf I., Gautier-Bouchardon A.V., jouy E., Kobisch M. (2002) "Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 50: 201-209.

Martel A, Baele M, Devriese LA, Goossens H, Wisselink HJ, Decostere A, Haesebrouck F. (2001) "Prevalence and mechanism of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus suis* isolates". Vet Microbiol. 83:287-97.

Martel, A., Decostere A., De Leener E., Marien M., De Graef E., Heyndrickx M., Goosens H., Lammens C., Devriese L.A. Haesernbrouk F. (2005) "Comparison and transferability of the *erm*(B) genes between human and farm animal streptococci." Microbial Drug Resistance 11:295-302.

Wisselink H., Veldman K.T., Van den Eede C., Salmon S.A., Mevius D.J. (2006) "Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licenced in veterinary medicine". Vet.Microbiol. 113, 73-82.

ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* ISOLATI DA SUINI SINTOMATICI ED ASINTOMATICI MEDIANTE PFGE

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF STREPTOCOCCUS SUI*S ISOLATES FROM SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC PIGS BY PFGE*

CHIARA MAGISTRALI[1], BRUNA FACINELLI[2], MARIA STELLA PRINCIVALLI[2], SIMONE BAROCCI[1], LUCILLA CUCCO[1], FRANCESCA CIUTI[1], GLORIA MAGI[2], CLAUDIO PALMIERI[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy;*
[2] *Institute of Microbiology and Biomedical Sciences, Polytechnic University of Marche Medical School, Ancona, Italy*

Parole chiave: *Streptococcus suis*, suino, PFGE
Key words: *Streptococcus suis,* swine, PFGE

Riassunto. Scopo del presente lavoro è stato caratterizzare geneticamente ceppi di *Streptococcus suis* isolati in Italia centro-settentrionale dal 2003 al 2007. I ceppi (n=60), provenivano da suini sintomatici (meningite, setticemia e polmonite) o asintomatici (tonsille prelevate al macello). L'analisi condotta mediante PFGE dopo digestione con enzima *SmaI*, ha dimostrato una notevole variabilità genetica degli isolati (33 differenti pulsotipi), anche se 22 dei ceppi studiati (~ 38%), appartenevano ad un unico pulsotipo, diffuso su tutto il territorio in esame. I risultati evidenziano la complessa epidemiologia dei ceppi di *S.suis* circolanti negli allevamenti suini italiani, e confermano l'utilità della PFGE nelle indagini epidemiologiche delle infezioni da *S.suis*.

Abstract. Aim of this work was to analyse genetic diversity of *Streptococcus suis* isolates recovered in central and northern Italy from 2003 to 2007. The study included 60 isolates from symptomatics (meningitis, septicaemia and pneumonia) or asymptomatic (tonsils) pigs. PFGE analysis yielded 33 different pulsotypes, showing a great genetic heterogeneity of Italian *S.suis* isolates. However a widespread diffusion of one pulsotype, accounting 22 isolates (~ 38%), was reported. These results suggest a complex epidemiology of *S. suis* strains circulating in Italian swine herds, and confirm the usefulness of PFGE typing in epidemiological investigations of *S. suis* infection.

Introduzione

Streptococcus suis è considerato uno dei maggiori patogeni dell'allevamento suino intensivo in tutto il mondo. Le principali patologie associate a *S. suis* sono meningite, setticemia, e artrite. *S. suis* viene tuttavia isolato anche da suini asintomatici, che pos-

sono lo albergano a livello tonsillare e che possono fungere da *carrier* (Wisselink, 2002). Il controllo della streptococcosi negli allevamenti si basa attualmente sull'impiego di vaccini e di antimicrobici. Tuttavia, a causa della grande variabilità dei ceppi di *S.suis* circolanti, l'impiego dei vaccini non sempre è efficace e si è registrato un aumento della resistenza nei confronti di alcune categorie di antibiotici (Wisselink, 2006).
Parallelamente a questo ruolo di patogeno nel suino, è tuttavia da tempo riconosciuto a *S.suis* anche quello di agente di zoonosi di tipo professionale. Questa caratteristica è stata particolarmente enfatizzata dall'episodio di streptococcosi umana a carattere epidemico registrato in Xinhua, Cina, nel 2005, durante il quale si sono registrati 215 casi, 38 dei quali letali (Yu, 2006). In seguito a quell'episodio, si è osservato in tutto il mondo un aumento delle segnalazioni di casi di streptococcosi umana (Gottschalk, 2007).
Nonostante l'importanza di *S.suis*, mancano in Italia lavori recenti che indaghino le caratteristiche epidemiologiche di questo batterio. In particolare, a partire dal 2001, è stato dimostrato come la PFGE, *Pulsed Field Gel Elecrophoresis,* sia un metodo affidabile e ripetibile per la caratterizzazione di questo batterio. Questa tecnica è stata impiegata anche in Europa per effettuare indagini epidemiologiche su isolati umani e suini di *S. suis,* come ad esempio in Spagna (Vela et al., 2003; Berthelot-Herault et al, 2002).
Scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare ceppi di *S. suis* isolati in Italia centro-settentrionale dal 2003 al 2007, sia da casi clinicamente manifesti che da soggetti asintomatici.

Materiali e metodi

Ceppi: i ceppi descritti sono stati isolati mediante tecniche di batteriologia tradizionale da cervello, milza o polmone, oppure da tonsille di animali clinicamente sani, regolarmente macellati: in particolare, 23 isolati provenivano da cervello, 22 da polmone, 12 da milza e 3 da tonsille. 7 ceppi sono stati isolati nel 2003, 13 nel 2004, 3 nel 2005, 8 nel 2006 e 30 nel 2007. Gli allevamenti erano localizzati in Italia centrale o settentrionale. In qualche caso, da un singolo allevamento, sono stati identificati e sottoposti ad analisi più isolati, appartenenti ad uno stesso evento epidemico, o in mesi o in anni diversi (figura 1). In particolare, 23 isolati provenivano dalla provincia di Perugia, e di questi 10 sono stati isolati in diversi momenti epidemici da uno stesso allevamento. Gli allevamenti della provincia di Perugia sono stati in totale 8, a quali si aggiunge il mattatoio da cui sono state prelevate le tonsille. I ceppi isolati nella provincia di Ascoli Piceno (5 aziende diverse) sono risultati 16. Anche in questo caso, in un unico allevamento sono stati identificati in anni diversi 10 isolati. 10 isolati provenivano da Reggio Emilia, mentre meno rappresentate sono state le province di Macerata, Livorno, Arezzo, Pesaro-Urbino, Chieti, Ischia, Latina e Terni. La caratterizzazione di specie è stata effettuata mediante sistema ID32Strep (Biomerieux). I ceppi sono stati conservati mediante liofilizzazione o congelati.
PFGE: L'analisi di PFGE è stata condotta come descritto da Tenover (Tenover 1995).

Risultati

L'analisi condotta mediante PFGE dopo digestione con enzima *Sma*I, ha permesso di evidenziare la presenza di 33 pulsotipi differenti (Figura 1)
22 isolati, diffusi in quasi tutte le province esaminate, da Reggio Emilia a Ascoli Piceno, Arezzo, Perugia, Macerata e Latina a partire dal 2003 fino al 2007, risultavano appartenere ad un unico pulsotipo. In alcuni allevamenti ceppi appartenenti a questo clone sono stati ripetutamente isolati; da solo o con isolati appartenenti a pulsotipi diversi. ad esempio, nell'allevamento pg 1 il clone dominante è stato isolato in diversi episodi di meningite dal 2003 fino al 2007; nel 2004 tuttavia, sempre nel corso di un episodio di meningite, nello stesso allevamento è stato isolato il ceppo v36, caratterizzato da un pulsotipo completamente diverso. Ancora più eterogenei i pulsotipi dei ceppi isolati nel 2006-2007 da casi di polmoniti e setticemie nell'allevamento ap1.

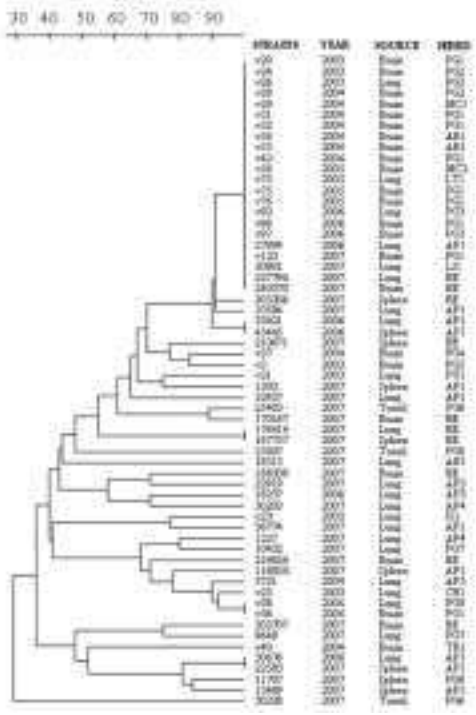


Figura 1. Dendrogramma ottenuto dopo analisi in PFGE (SmaI). Vengono indicati, parallelamente all'identificativo dei ceppi (strains), l'anno (year), l'organo e l'allevamento origine (herd).

Discussione

Lo studio ha permesso di identificare una notevole variabilità genetica degli isolati di *S.suis*; in linea con quanto documentato in altri paesi europei. (Vela et al, 2003). D'al-

tra parte, è stata dimostrata la presenza di un clone predominante, diffuso in tutto il territorio sotto esame . Ceppi appartenenti a questo clone, tutti isolati da suini con meningite e setticemia, hanno circolato in alcuni degli allevamenti esaminati per tutta la durata del periodo studiato (dal 2003 al 2007). D'altra parte la presenza di ceppi con differenti pulsotipi all'interno di una stessa azienda conferma l'ampia diffusione e la complessità nella circolazione di questo batterio nei singoli allevamenti.
La tipizzazione mediante PFGE permette di individuare l'eventuale origine clonale di infezioni da *S.suis* in un'azienda ed è quindi uno strumento interessante, in quanto potrebbe essere impiegata nei casi in cui sia necessario valutare una risposta all'impiego di presidi vaccinali, in particolare per quelli di tipo stabulogeno. La PFGE è uno strumento dotato di capacità discriminanti superiori a quelle della tipizzazione capsulare; indagini epidemiologiche periodiche di questo tipo sono importanti, soprattutto in considerazione delle potenzialità zoonosiche di questo microrganismo.

Si ringraziano la Dr.ssa Marta Paniccià e il Dr. Giuseppe Merialdi per avere cortesemente fornito parte dei ceppi impiegati nel lavoro.

Bibliografia

Berthelot-Herault F., Marois C., Gottschalk M., Kobisch M. (2002) "Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis". J. Clin. Microbiol. 40, 615-619.

Camporese A, Tizianel G, Bruschetta G, Cruciatti B, Pomes A. (2007) "Human meningitis caused by *Streptococcus suis*: the first case report from north-eastern Italy." Infez. Med. 15:111-114.

Gottschalk, M. (2007) "Lessons learned from China's *Streptococcus suis* outbreak: risk for humans". In: Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, March 3-6 2007 Orlando, Florida: 377-380.

Vela A.I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M.A., Borge C., Perea J.A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F. (2003) "Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by Pulsed-Field gel electrophoresis". J. Clin. Microbiol. 41, 2498-2502.

Yu H., Jing H., Chen Z., Zheng H., Zhu X., Wang S., Liu L., Zu R., Luo L., Xiang N., Liu H., Liu X., Shu Y., Lee S., Chuang S.K., Wang Y., Xu J., Yang W. (2006) "Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China". Emerg. Infect. Dis. 12: 914-920.

Wisselink H.J., Joosten J.J., Smith H.E. (2002) "Multiplex assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs". J. Clin. Microbiol. 40: 2922-2929.

Wisselink H., Veldman K.T., Van den Eede C., Salmon S.A., Mevius D.J. (2006) "Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licenced in veterinary medicine". Vet. Microbiol. 113, 73-82.

Tenover F.C., R. Arbeit D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D. H., Swaminathan B. (1995) "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing". J. Clin. Microbiol. 33**,** 2233-2239.

CONCORDANZA TRA DIVERSI METODI PER LA DIAGNOSI DI ENTERITI BATTERICHE DEL MAGRONAGGIO E INGRASSO DELLA SPECIE SUINO

AGREEMENT BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC TESTS FOR BACTERIAL ENTERITIS IN GROWERS AND FATTENERS

CATANOSSI M.[1], CROTTI S.[2], MARENZONI M.L.[1], MARESCA C.[2], SENSI M.[2], TENTELLINI, M.[2],VALENTE C.[1], MAGISTRALI C.F.[2]

[1] Dipartimento Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Malattie Infettive, Università di Perugia; [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche, Perugia

Parole chiave: *Brachyspira*, suino, diagnosi
Key words: *Brachyspira*, swine, diagnosis

Riassunto. Nel suino, le enteriti batteriche del magronaggio e ingrasso sono legate principalmente alle infezioni causate da *Brachyspira hyodysenteriae*, *B.pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis*. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare diversi test diagnostici già disponibili per le enteriti batteriche del magronaggio e ingrasso. Un test in multiplex PCR, da impiegarsi direttamente su materiale fecale, e diretto a tutti e tre questi patogeni, è stato confrontato con l'esame batteriologico per *Brachyspira* spp. e con una combinazione di esame batteriologico e PCR dopo tre giorni di incubazione. Inoltre, gli esiti della PCR multiplex sono stati confrontati con un test in nested PCR per *Lawsonia intracellularis*. L'esame batteriologico per *Brachyspira* spp. e il test in nested PCR per *Lawsonia intracellularis* sono stati utilizzati come *gold standard* per il calcolo di sensibilità, specificità e concordanza mediante il test kappa di Cohen. Complessivamente, sono stati esaminati 102 campioni di feci provenienti da animali con o senza diarrea. I risultati mostrano una riduzione della sensibilità di circa il 24% per *B. hyodysenteriae*, sia impiegando il test multiplex PCR direttamente sulle feci che applicandolo sulle colture dopo 3 giorni di incubazione. Gli stessi risultati sono stati ottenuti per *B. pilosicoli*, confrontando il test multiplex PCR sulle feci e l'esame colturale, mentre una buona concordanza (k=0,823) si è osservata tra test in multiplex PCR dopo 3 giorni di incubazione e esame colturale. Infine, il test multiplex PCR per il rilievo di *Lawsonia intracellularis,* confrontato con il *gold standard* ha rivelato una sensibilità pari al' 80% e specificità al 67%.

Abstract. In swine, bacterial enteritis in growers and fatteners are due mainly to infections by *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis*. The aim of this study was to evaluate different diagnostic tests available for bacterial enteritis in growers and fatteners. A multiplex PCR test, performed directly from faeces, and directed to *Brachyspira pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis*, was put in comparison with bacteriological test for *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*, and a combination of bacteriological test and PCR on culture plates after

three days of incubation. Moreover, results of multiplex PCR test for *Lawsonia intracellularis* were compared with a nested PCR test for *L. intracellularis*. Bacteriological test for *Brachyspira* spp. and nested PCR for detection of *L. intracellularis* were used as gold standard for Cohen's kappa test. Results shown a reduced sensitivity of multiplex PCR, single or after 3 days of incubation, for detection of *B. hyodysenteriae*. The same results was found for *B. pilosicoli* between multiplex PCR directed to faeces and culture, while a good agreement was shown between culture and PCR after 3 days of incubation. Finally, multiplex PCR directed to *L. intracellularis* have a sensitivity of 80% and specificity of 67% wen compand to *gold* standard test.

Introduzione

I più frequenti agenti batterici responsabili di enteriti del suino, nel periodo di magronaggio ed ingrasso, sono rappresentati da *Lawsonia intracellularis*, responsabile della enteropatia proliferativa suina (PPE) e due specie batteriche appartenenti al genere *Brachyspira*, *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae,* rispettivamente responsabili della spirochetosi intestinale (PIS) e della dissenteria suina (DS) o enterite necrotica (Straw, 1999). Mentre la PIS, della quale non si conosce ancora l'importanza in termini economici, è stata segnalata recentemente (Bonilauri, 2002), la DS costituisce tuttora una patologia altamente diffusa che provoca notevoli perdite agli allevamenti (Costarelli et al., 2004 , Merialdi, 2003). Si tratta di malattie caratterizzate da diarrea e mancato incremento ponderale e, soprattutto quando l'evoluzione è subclinica o cronica, è necessario ricorrere al laboratorio per una diagnosi di certezza ed una corretta terapia (Nathues, 2007). Per quanto riguarda le infezioni da *Brachyspira* l'isolamento del microrganismo viene effettuato mediante un esame batteriologico selettivo e quindi si procede con la identificazione biochimica e/o biomolecolare (PCR).
Queste metodiche prevedono tuttavia tempi di riposta piuttosto lunghi (5-10 giorni), e sono costose. *Lawsonia intracellularis* è invece coltivabile solo con difficoltà su tessutocolture , e viene quindi comunemente identificata direttamente nelle feci, solo con test di tipo molecolare (La, 2003; La, 2006; Natheus, 2007).
Nel corso degli ultimi anni sono stati quindi proposti metodi diagnostici alternativi; ad esempio, alcuni autori hanno valutato la possibilità di applicare test in PCR per il rilevo di *Brachyspira* sulle piastre colturali dopo una incubazione abbreviata, nel tentativo di ridurre i tempi di risposta. Altri autori hanno invece messo a punto metodi basati sull'impiego di test PCR per il rilievo di *Brachyspira* direttamente da materiale fecale (Atyeo, 1998, Atyeo, 1999, Fellstrom, 1997, Leser, 1997).
Particolarmente interessante la metodica proposta da La *et al.* (2006) che prevede l'applicazione di una multiplex PCR diretta a *B. pilosicoli*, *B.hyodysenteriae* e *L. intracellularis* con un unico test applicato direttamente sulle feci.
Questa metodica consentirebbe di abbreviare i temi di risposta, ridurre i costi per la diagnosi e in ultima analisi consentirebbe di adottare misure specifiche e tempestive in corso di enteriti del magronaggio e ingrasso.
Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di mettere a confronto la multiplex PCR

di La *et al* (2006) con l'esame colturale per la ricerca di *Brachyspira* spp. e con la nested-PCR di Jones (1993) per il rilievo di *Lawsonia intracellularis*, utilizzate come *gold standard* diagnostico. Analogamente, è stata valutata la possibilità di impiegare il test in multiplex PCR per la diagnosi delle forme da *Brachyspira pilosicoli* e *hyodysenteriae* dopo incubazione a 3 giorni dell'esame colturale.

Materiali e metodi

Casi: sono stati esaminati complessivamente 102 campioni di feci di suino del periodo del magronaggio ed ingrasso, che mostravano o meno diarrea. Tutti i campioni sono stati esaminati in parallelo con le seguenti metodiche:
esame colturale selettivo per Brachyspira spp.: veniva effettuata una semina del materiale fecale in TSA-BJ medium, seguita da incubazione a 41,5 °C ± 1°C per almeno 5 giorni. Al termine del periodo di incubazione, veniva osservata la presenza di una eventuale emolisi. In caso di assenza di emolisi, l'esame veniva chiuso come negativo. In caso di presenza di emolisi, veniva effettuata una colorazione di Gram o con Blu Vittoria dell'area di crescita corrispondente all'emolisi, e il vetrino era osservato in microscopia ottica, per il rilievo di microrganismi dalla morfologia tipica di *Brachyspira* spp. In caso di positività, la piastra veniva sottoposta ad estrazione previa bollitura seguita da PCR in base a quanto indicato da Laser *et al*. modificando la quantità finale di Taq (1997), specifico per le due sole specie *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*. In caso di negatività, l'esame veniva chiuso come negativo.
Test in multiplex PCR: il test è stato effettuato direttamente a partire da materiale fecale, previa estrazione, secondo quanto indicato da La *et al.(*2006).
Test in multiplex PCR dopo 3 giorni di incubazione: il test PCR multiplex, eseguito in base a quanto descritto da La *et al.* (2006) ma senza i primer diretti *vs*. *Lawsonia intracellularis*, è stato eseguito dopo esame colturale eseguito come sopra descritto. Dopo 3 giorni di incubazione su TSA-BJ medium a 41,5 °C ± 1°C, le piastre venivano direttamente sottoposte ad estrazione previa bollitura quindi a PCR come sopra descritto, senza effettuare nessuna lettura.
Test nested PCR: il test è stato eseguito in base a quanto descritto da Jones (1993), direttamente dal materiale fecale.

Elaborazione statistica dei dati: sono stati valutati la sensibilità, la specificità ed l'indice di Youden's. Questo parametro unisce le informazioni relative alla sensibilità e specificità della previa diagnostica.
La concordanza tra i metodi diagnostici è stata calcolata con il test Kappa di Cohen confrontando i risultati ottenuti dei test con quelli ottenuti tramite le prove diagnostiche considerate gold standard.
L'indice statistico di Cohen quale misura di riproducibilità è stato considerato "ottimo" il risultato espresso da un valore di $K > 0.81$, molto buono quando il valore K ha oscillato tra 0.61 e 0.80, discreto tra 0.41 e 0.60, moderato tra 0.21 e 0.4 e scarso quando il valore è risultato inferiore a 0.2.

Risultati

I risultati relativi a i tre test applicati per il rilievo di *B. pilosicoli* nei 102 campioni di feci sono indicati nelle tabelle 1, 2 e 3. In tabella 1 sono indicate le frequenze semplici relative al numero di positivi e negativi per ciascuna metodica. In tabella 2 sono descritti gli esiti ottenuti dopo confronto con il *gold standard* . In tabella 3 sono indicati i valori di Kappa ottenuti.

Tabella 1. Frequenze semplici relative ai risultati dei test per il rilievo di *B.pilosicoli*

	Gold standard	Multiplex PCR da feci	Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni
Positivi	6 (5,9%)	4 (3,9%)	6 (5,9%)
Negativi	96 (94,1%)	98 (96,1%)	96 (94,1%)
Totale	102 (100%)	102 (100%)	102 (100%)

Tabella 2. Sensibilità, specificità e coefficiente di Youden'S J. dei due test per il rilievo di *B.pilosicoli* a confronto con il *gold standard*

	Sensibilità	Specificità	Youden's J
Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni	83,33%	98,96%	0,8229 (0,5240-1)
Multiplex PCR da feci	50,00%	98,96%	0,4896 (0,089-0,8902)

Tabella 3. Calcolo del coefficiente kappa dei due test per il rilievo di *B.pilosicoli* a confronto con il *gold standard*

	Kappa
Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni	0,823
Multiplex PCR da feci	0,580

I risultati relativi a i tre test applicati per il rilievo di *B. hyodysenteriae* nei 102 campioni di feci sono indicati nelle tabelle 4, 5 e 6. In tabella 4 sono indicate le frequenze semplici relative al numero di positivi e negativi per ciascuna metodica. In tabella 5 sono descritti specificità e sensibilità ottenuti dopo confronto con il gold standard, mentre in tabella 6 viene riportato il valore di kappa, sempre ottenuto dal confronto con il gold standard.

Tabella 4. Frequenze semplici relative ai risultati dei test per il rilievo di *B.hyodysenteriae*

	Gold standard	Multiplex PCR da feci	Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni
Positivi	25 (24,5%)	23 (22,5%)	21 (20,6%)
Negativi	77 (75,5%)	79 (77,5%)	81 (79,4%)
Totale	102 (100%)	102 (100%)	102 (100%)

Tabella 5. Sensibilità, specificità e coefficiente di Youden'S J. dei due test per il rilievo di *B.hyodysenteriae* a confronto con il *gold standard*

	Sensibilità	Specificità	Youden's J
Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni	76,00%	97,40%	0,7340 (0,5629-0,9052)
Multiplex PCR da feci	76,00%	94,81%	0,7094 (0,5351-0,8836)

Tabella 6. Calcolo del coefficiente kappa dei due test per il rilievo di *B.hyodysenteriae* i a confronto con il *gold standard*

	Kappa
Multiplex PCR dopo incubazione a 3 giorni	0,776
Multiplex PCR da feci	0,728

I risultati relativi a i due test applicati per il rilievo di *L.intracellularis* nei 102 campioni di feci sono indicati nelle tabelle 7 e 8. In tabella 7 sono indicate le frequenze semplici relative al numero di positivi e negativi per ciascuna metodica. In tabella 8 sono descritti specificità e sensibilità ottenuti dopo confronto con il *gold standard.*

Tabella 7. Frequenze semplici relative ai risultati dei test per il rilievo di *L.intracellularis*

	Gold standard Multiplex	PCR da feci
Positivi	7 (6,9%)	37 (36,3%)
Negativi	95 (93,1%)	65 (67,7%)
Totale	102 (100%)	102 (100%)

Tabella 8. Sensibilità, specificità e coefficiente di Youden'S J. del test per il rilievo di *L.intracellularis* a confronto con il *gold standard*

	Sensibilità	Specificità	Youden's J
Multiplex PCR da feci	80,00%	67,00 %	0,4599

Discussione

Nel corso di questo lavoro diverse metodiche per i rilievo delle principali enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso del suino sono state messe a confronto, allo scopo di valutarne la concordanza con test diagnostici correntemente in uso, utilizzati come *gold standard*.

Il metodo diagnostico di riferimento per le enteriti da *Brachyspira* è l'esame colturale, che si è dimostrato una tecnica sensibile , in grado di identificare fino a 140 cellule batteriche per grammo di feci; questo test, tuttavia, presenta evidenti limiti, legati ai lunghi tempi di risposta; inoltre, richiedendo specifici reattivi ed essendo di laboriosa esecuzione, è piuttosto costoso (Rasback, 2006).

Il confronto tra le diverse metodiche impiegate per *Brachyspira spp.*, ha mostrato come la multiplex PCR, applicata direttamente sul materiale fecale, presenti una sensibilità inferiore rispetto all'esame colturale, quantificata come il 50% e il 76% rispettivamente per *B.pilosicoli* e *B.hyodysenteriae*. La specificità si è mantenuta invece elevata in tutte e due i casi. Il calo di sensibilità descritto si è tradotto in un coefficiente kappa classificato come discreto in entrambi i casi secondo la scala di Altman.
La diminuzione di sensibilità dei test per *Brachyspira* applicati direttamente sulle feci è stata osservata da altri autori e può essere attribuita alla presenza di fattori di inibizione presenti nel materiale fecale, quali bilirubina e sali biliari (Rasback, 2006; Nathues, 2007), anche se il kit commerciale basato sull'impiego di membrane al silicio, utilizzato nel corso di questo lavoro, è quello che si è dimostrato maggiormente efficace per le estrazioni da questo tipo di materiale (Nathues, 2007).
Per quanto riguarda la metodica in multiplex PCR eseguita direttamente sulle feci, il calo di sensibilità non consiglia al momento una sua applicazione nella *routine* diagnostica delle forme da *Brachyspira.* E' inoltre noto come l'impiego di presidi terapeutici in assenza di una diagnosi eziologica abbia comportato un aumento delle resistenze agli antimicrobici da parte di Brachyspira spp, per la quale già esistono pochi antibiotici attivi (Pringle, 2006, Karllson, 2004). Per questo motivo, appare importante mantenere la disponibilità di ceppi batterici, ottenibili solo mediante esame colturale, per potere eseguire monitoraggi periodici sull'andamento della antibiotico sensibilità.
L'applicazione della incubazione a 3 giorni prima dell'esecuzione della multiplex PCR ha comportato un vantaggio per *B. pilosicoli* (sensibilità 83,3%, kappa 0,823) ma non per *B. hyodysenteriae* (sensibilità 76%, kappa 0,776).
Questo metodo è quindi difficilmente consigliabile; poiché comporta solo un relativo risparmio in termini di tempo (2-3 giorni circa), senza d'altra parte apportare vantaggi in termini di sensibilità per la specie di *Brachyspira* più importante.
Per quanto riguarda *Lawsonia intracellularis*, si è osservata una percentuale di positivi insospettatamente elevata con la metodica in multiplex PCR rispetto al *gold standard* a differenza di quanto atteso. Il sequenziamento delle bande ottenute dopo amplificazione in PCR è in corso e potrà confermare o meno l'effettiva attribuzione delle positività a *Lawsonia intracellularis.*
Concludendo, il test colturale appare ancora il metodo più sensibile per il rilievo delle infezioni da *Brachyspira pilosicoli e hyodysenteriae.* Rispetto al test PCR eseguito direttamente sulle feci presenta inoltre il vantaggio di potere isolare i ceppi, e quindi permette il rilievo di specie di *Brachyspira* di dubbia patogenicità.
Il test in multiplex PCR applicato direttamente sulle feci può tuttavia essere impiegato, in parallelo con l'esame colturale, in caso di focolai di enterite del magronaggio ingrasso di particolare importanza e gravità, quando una risposta tempestiva fosse importante per impostare una corretta terapia antimicrobica.

Bibliografia

Atyeo RF, Oxberry SL, Combs BG, Hampson DJ. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis.

Lett Appl Microbiol. 1998 Feb;26(2):126-30.
Atyeo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarachichi DS, Hampson DJ. Differentiation of Serpulina species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. Vet Microbiol. 1999 Jun 1;67(1):47-60
Bonilauri, P., Merialdi, G., Perini, S., Vezzali, Dottori, M. (2002) "Primo isolamento di Brachyspira pilosicoli dal suino in Italia". Obiettivi e documenti Veterinari, 1: 15-19.
Costarelli S., Maresca C., Crotti S., Magistrali C., Manuali E., Sensi M., 2004. Infezioni da *Brachyspira* nel suino. Studio trasversale su suini da ingrasso in allevamenti Umbri.ODV Obiettivi e Documenti Veterinari N° 2: 17-21
Fellström C, Pettersson B, Thomson J, Gunnarsson A, Persson M, Johansson KE. Identification of Serpulina species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J Clin Microbiol. 1997 Feb;35(2):462-7.
Jones, G.F.,. Ward, G. E, Murtaugh, M. P,. Lin, G and J. Gebhart (1993) " Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction". Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1993, p. 2611-2615.
La, T., A. M. Collins, N. D. Phillips, A. Oksa, D. J. Hampson (2006) "Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysentariae, and Brachyspira pilosicoli in porcine faeces". Letters in Applied Microbiology 42 (2006) 284-288.
La, T., Phillips, N., Hampson, D.J. (2003) Development of a duplex PCR assay for detection of Brachyspira hyodysentariae and Brachyspira pilosicoli in pig feces. J. Clin. Microbiol. 41: 3372-3375.
Leser, T. D., K. Møller, T. K. Jensen, S. E. Jorsal (1997) ìSpecific detection of Serpulina hyodysenteriae and potentially pathogenic weakly b-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA". Molecular and Cellular probes (1997) 11, 363-372.
Merialdi G., Bonilauri P., Granelli F., Luppi A ., Dottori M. (2003) Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. Vet Rec., 25: 529-530.
Natheus, H., Oliveira, C.J.B., Wurm, M., Grosse Beilage, E.; Givisiez, P.E.N. (2007) Simultaneous detection of Brachyspira hyodysenteriae, Brachyspira pilosicoli and Lawsonia intracellularis in porcine feces and tissue samples by multiplex-PCR. J.Vet.Med. A 54, 532-538.
Rasback, T., Fellstrom, C., Gunnarsson, A., Aspan, A. (2006) Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of barchyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli. Journal of Microbiological methods 66: 347-353.
Straw, B.E., Dewey, C.E., Wilson, M.R. (1999) Differential diagnosis of Swine diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. Diseases of Swine. Iowa State Press Ames Iowa pp. 41-89.
Weissenböck H, Maderner A, Herzog AM, Lussy H, Nowotny N. Amplification and sequencing of Brachyspira spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of Brachyspira murdochii. Vet Microbiol. 2005 Nov 30;111(1-2):67-75.
Pringle M, Landén A, Franklin A Tiamulin resistance in porcine Brachyspira pilosicoli isolates Res Vet Sci. 2006. 80(1):1-4.
Karlsson M, Aspán A, Landén A, Franklin A Further characterization of porcine Brachyspira hyodysenteriae isolates with decreased susceptibility to tiamulin. J Med Microbiol. 2004 Apr;53(Pt 4):281-5.

OSSERVAZIONI AL MACELLO SULLA PATOLOGIA DEL RACHIDE DEL SUINO PESANTE ITALIANO: STUDIO PRELIMINARE

PATHOLOGY OF ITALIAN HEAVY PIG'S VERTEBRAL COLUMN: PRELIMINARY STUDY

MICHELE APICELLA [(1)], MONICA GIBERTI [(1)], MARIA TERESA CAPUCCHIO [(2)], DEBORAH CATALANO[(2)], FEDERICA SAMMARTANO[(2)], ALBERTO VALAZZA[(2)], PIETRANGELO PERRONE[(3)], FRANCO GUARDA[(3)].

[1]Servizi Veterinari ASL CN1 Regione Piemonte; [2]Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino; [3]Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino

Parole chiave: rachide, lordosi, cifosi, ascessi
Key words: vertebral column, lordosis, kyphosis, abscesses

RIASSUNTO. Tra gennaio e dicembre 2007, in due macelli della provincia di Cuneo, denominati A e B, sono stati osservati n° 15898 suini, regolarmente macellati all'età di circa 9 mesi e ad un peso di 150-170 kg. L'attenzione è stata rivolta alle seguenti patologie della colonna vertebrale:
– lordosi
– cifosi
– ascessi
al fine di valutarne prevalenza, morfologia, localizzazione lungo il rachide, profilo radiografico ed istopatologico, individuando inoltre gli allevamenti maggiormente affetti da suddette patologie. Quest'ultimo aspetto è ritenuto di particolare importanza ai fini di ulteriori approfondimenti volti ad evidenziare eventuali linee genetiche predisposte a manifestare difetti del rachide. Si è tentato altresì di comprendere, con l'aiuto della radiologia, le ragioni dell'assenza di una sintomatologia clinica evidente nei suini portatori di lesioni vertebrali talora molto gravi.

SUMMARY. Between January and December 2007 in two slaughterhouses near Cuneo city, called A and B, n. 15898 regularly slaughtered pigs were investigated. All animals were aged more than 9 months and with a body weight of 150-170 kg,.
Attention was turned to these pathologies of the vertebral column:
– lordosis
– kyphosis
– abscesses
in order to estimate their prevalence, morphology, localization, radiografic and histological features and to evaluate also the more affected breeds. This last observation is very important in order to know possible genetical lines which can show more frequently these defects.

INTRODUZIONE

Accade con una certa frequenza, nel corso dell'attività ispettiva nei macelli, di osservare alterazioni del normale quadro anatomico e/o funzionale di suini macellati regolarmente poichè privi di sintomi clinici rilevabili alla visita ante-mortem.Talvolta si tratta di lesioni che non hanno effetti diretti sulle performances produttive e/o sanitarie della popolazione allevata, né ricadute sul giudizio ispettivo finale, non per questo però meno degne di attenzione e di approfondimento da parte del veterinario ispettore. Gli studi che scaturiscono da siffatte osservazioni non sempre giungono a catturare l'attenzione di platee molto sensibili ad argomenti di rilevanza economica e neppure consistono in astratti esercizi accademici; sono però finalizzati a meglio conoscere la specie suina, attraverso la valutazione statistica della tipologia e frequenza dei difetti riscontrati e l'approfondimento dei risvolti istopatologici, nonchè della patologia comparata rispetto a quanto accade nella specie umana e nelle altre specie animali.
In tale contesto si inserisce il presente studio che ha come oggetto le patologie del rachide dei suini macellati ad un età di circa nove mesi e ad un peso medio di 150-170 kg. Data la giovane età dei suini considerati, agli autori non pare azzardato il confronto con le analoghe alterazioni del rachide dell'uomo in età giovanile come la cifosi di Scheuermann (Wenger and Frick, 1999).

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra gennaio e dicembre 2007, nel corso delle normali attività ispettive presso due stabilimenti di macellazione CEE (denominati macello A e macello B) della provincia di Cuneo, si è proceduto all'**osservazione macroscopica**, alla **misurazione** ed alla **rilevazione fotografica** dei difetti del rachide di suini di età di nove mesi circa regolarmente macellati e pertanto privi di evidenti deficit locomotori. Si è proceduto altresì alla **registrazione** delle lesioni riscontrate e dei relativi allevamenti onde ottenere una valutazione statistica quanto più significativa possibile della frequenza delle suddette lesioni. Per quanto riguarda in particolare le **deviazioni della colonna** si è ritenuto opportuno raggruppare i difetti delle colonne per gradi di gravità, suddividendo le lesioni in:
– lesioni lievi: lordosi da 1 a 2 cm del profilo dorsale dei corpi vertebrali,
– lesioni medie. lordosi > 2 cm del profilo dorsale dei corpi vertebrali,
– lesioni gravi: lordosi + cifosi + spondilite o lordosi multiple.
A margine, sono stati registrati tutti gli **ascessi** rilevati nel corso delle visite ispettive, valutandone la prevalenza.
Per la raccolta dei dati è stata predisposta un'apposita scheda su cui, per ogni giornata di macellazione, venivano registrati:
– numero di animali macellati suddivisi per allevamento,
– numero di deviazioni della colonna suddivise per gravità,
– numero e tipologia delle altre lesioni (ascessi, sinostosi ecc.),
– numero di tatuaggio auricolare.
Sono stati inoltre eseguiti **prelievi di tratti di colonna vertebrale**, inviati al Diparti-

mento di Patologia Animale dell'Università di Torino per gli **approfondimenti radiografici ed istopatologici**.

RISULTATI

Le patologie osservate, si configuravano essenzialmente nelle seguenti forme:
– deviazioni assiali del rachide e
– ascessi.
I dati statistici riferiti alle deviazioni sono stati raccolti nella tabella e nel grafico n.1 per il macello A e nella tabella e nel grafico n. 2 per il macello B.

Tab. 1. Macello A
Tab. 1. *Slaughterhouse A*

DEVIAZIONI RACHIDE: macello A								
Allevatore	lieve	n. deviazioni media	grave	n. totale suini	% totale	% lievi	% medie	% gravi
1	71	78	10	4500	3,53	1,58	1,73	0,22
2	1	3	0	178	2,25	0,56	1,69	0,00
3	8	5	0	540	2,41	1,48	0,93	0,00
4	22	26	0	2335	2,06	0,94	1,11	0,00
5	15	9	0	950	2,53	1,58	0,95	0,00
6	5	6	0	420	2,62	1,19	1,43	0,00
7	9	14	0	680	3,38	1,32	2,06	0,00
8	6	3	0	500	1,80	1,20	0,60	0,00
9	4	1	0	170	2,94	2,35	0,59	0,00
10	3	4	0	460	1,52	0,65	0,87	0,00
11	1	0	0	70	1,43	1,43	0,00	0,00
12	5	8	0	610	2,13	0,82	1,31	0,00
13	0	2	0	40	5,00	0,00	5,00	0,00
14	0	0	0	80	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0	0	0	50	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTALE	150	159	10	11583	2,75	1,30	1,37	0,09

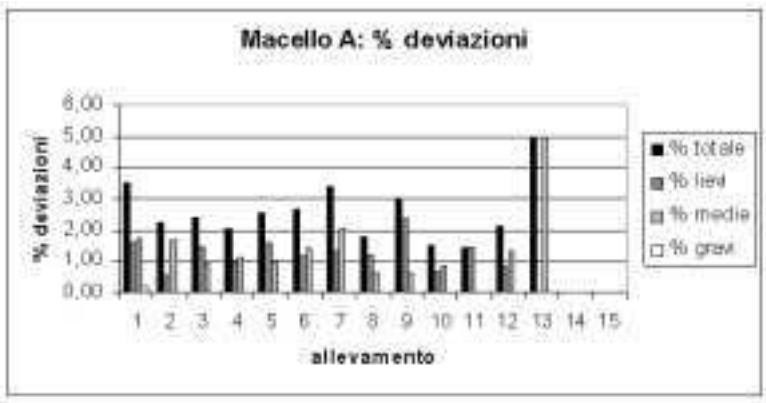


Grafico 1. Deviazioni rachide macello A
Graphic 1. *Vertebral column deviations, slaughterhouse A*

Tab. 2. Macello B
Tab. 2. *Slaughterhouse B*

DEVIAZIONI RACHIDE: macello B								
Allevatore	lieve	n. deviazioni media	grave	n. totale suini	% totale	% lievi	% medie	% gravi
1	5	3	1	320	2,81	1,56	0,94	0,31
2	1	2	1	427	0,94	0,23	0,47	0,23
3	4	7	1	320	3,75	1,25	2,19	0,31
4	8	8	0	286	5,59	2,79	2,79	0,00
5	3	2	0	246	2,03	1,22	0,81	0,00
6	1	2	0	300	1,00	0,33	0,67	0,00
7	7	5	0	740	1,62	0,94	0,67	0,00
8	3	3	0	150	4,00	2,00	2,00	0,00
9	1	2	0	640	0,47	0,16	0,31	0,00
10	3	4	0	360	1,94	0,83	1,11	0,00
11	4	1	0	150	3,33	2,66	0,67	0,00
12	2	5	0	150	4,67	1,33	3,33	0,00
13	2	4	0	226	2,65	0,88	1,77	0,00
TOTALE	44	48	3	4315	2,22	1,02	1,11	0,07

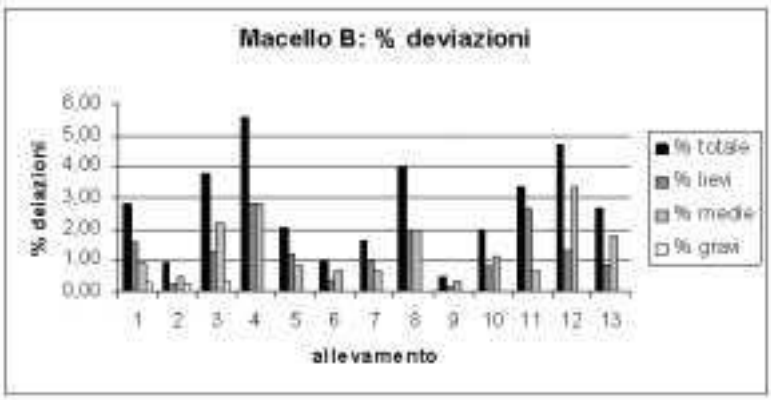


Grafico 2. Deviazioni rachide, macello B
Graphic 2. *Vertebral column deviations, slaughterhouse B*

Le **deviazioni assiali** del rachide interessavano sempre il tratto di colonna compreso tra T4/T5 e T8/T9 e si presentavano come **lordosi**, ossia con una curvatura anomala diretta verso l'interno del torace (Fig 1), mentre le **cifosi** si presentavano come curvature verso l'alto dei corpi vertebrali (Fig 2) talvolta fusi tra loro con aspetto di vere e proprie **sinostosi**.

Fig 1. Mezzena di suino con marcata lordosi
Fig. I. *Pig, vertebral column: severe lordosis*

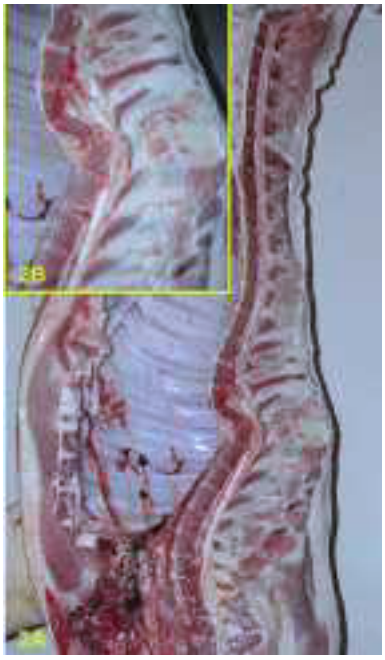


Fig 2. A) Mezzena di suino con grave cifosi. B) Particolare della figura 2A.
Fig 2. *A) Pig, vertebral column: severe kyphosis. B) Detail of the figure 2A.*

Sotto il profilo statistico, le suddette lesioni risultavano così distribuite:

	LIEVI	MEDIE	GRAVI	TOTALI
MACELLO A 11583 suini	1,30%	1,37%	0,09%	2,75%
MACELLO B 4315 suini	1,02%	1,11%	0,07%	2,22%

Sul totale della popolazione osservata la prevalenza corrispondeva al **2,6%.**
Gli allevamenti maggiormente colpiti, presentavano prevalenze elevate, fino al **5%.**
Sono stati sottoposti ad esame radiografico, nelle proiezioni LL e DV, sette segmenti toracici nei quali era stata osservata macroscopicamente la deviazione del rachide. Indipendentemente dal tipo di deformità riscontrata (4 lordosi, 3 cifosi (Fig 3), 1 lordosi + cifosi), in proiezione LL la deviazione risultava costantemente associata ad anomalie delle epifisi vertebrali, con assottigliamento più o meno evidente di una estremità epifisaria,dorsale o ventrale, rispetto all'altra e conseguente alterazione morfologica del corpo vertebrale. Nei casi più evidenti le vertebre assumevano la classica forma "a cuneo". Non si osservavano segni di spondilosi vertebrale o alterazioni della mineralizzazione metafisaria. In proiezione DV non si segnalavano, anche nei casi più gravi, deviazioni dell'allineamento dei processi spinosi.

Fig 3. Immagine radiologica in proiezione LL del tratto toraco-lombare con grave cifosi.
Fig 3. *Lateral radiograph of toraco-lumbar tract showing a severe kyphosis*

Gli **ascessi** presentavano localizzazioni diverse:
1. regione lombo-sacrale e
2. regione toracica

Alcuni avevano sede nel tessuto osseo del corpo vertebrale, altri impegnavano il canale neurale, altri ancora infiltravano gli spazi intervertebrali (discospondiliti purulente). Sono stati osservati n°**21** ascessi, con una prevalenza pari allo **0,13%.**

CONCLUSIONI

A conclusione del presente lavoro gli autori ritengono degne di nota alcune considerazioni.

Innanzitutto è interessante il fatto che **nessun animale avesse marcata sintomatologia clinica.** Nel corso della visita ispettiva ante-mortem non sono stati gravi rilevati deficit di deambulazione: tutti i suini erano in grado di camminare da soli dalla rampa di scarico alla postazione di stordimento pertanto nulla escludeva la regolare macellazione in ottemperanza alle norme sul benessere animale che regolamentano il trasporto dei "suini a terra". Si osservavano tuttavia alcuni difetti di postura (arti sotto di se ed inarcamento della colonna) e di deambulazione (passo corto, andatura sulle punte delle "dita", zoppicature e taluni atteggiamenti a "cane seduto"). Nella successiva ispezione delle carcasse si presentavano deviazioni talora molto accentuate della direzione della colonna vertebrale e/o ascessi che determinavano restringimenti e compressioni del canale neurale che comunque non avevano ancora compromesso l'integrità dei nervi spinali. Si ipotizza a tale riguardo l'attivazione di efficienti meccanismi di compensazione, quali allargamento del canale neurale nei punti critici e la variazione di lunghezza e inclinazione dei processi spinosi per la trazione esercitata dai potenti muscoli del dorso al fine di conservare una valida funzionalità locomotoria.

Dai dati relativi alle prevalenze si è rilevato che lordosi lievi, medie e gravi si equivalgono sostanzialmente sia nei diversi allevamenti sia nei due macelli. La prevalenza media si attesta intorno 2,6% analogamente a quanto riportato in letteratura (Nielsen et al., 2005). Negli allevamenti nei quali la prevalenza è superiore sarebbe interessante andare a valutare se vi siano condizioni predisponenti legate a fattori genetici o strutturali comuni (pavimenti, abbeveratoi e truogoli). Complessivamente pertanto il dato riscontrato conferma una discreta **omogeneità della popolazione.**

I reperti radiografici non hanno evidenziato rarefazioni della struttura ossea delle vertebre o altre anomalie scheletriche riferibili a rachitismo. Hanno però rilevato considerevoli variazioni di lunghezza ed inclinazione dei processi spinosi.

Circa le possibili **cause** di queste patologie del rachide ed in particolare delle deviazioni da quanto osservato emergerebbe che al loro determinismo concorrano una molteplicità di fattori quali ambiente, razza, linea genetica, forse traumatismi (Lahrmann et al., 1993; Corradi et al., 2004; Nielsen et al., 2005), ma come frequentemente accade, il fattore uomo sembra giocare un ruolo fondamentale. Infatti è da precise strategie e scelte zootecniche che deriva il suino attuale nel quale convivono straordinarie performances produttive ed inevitabili scompensi morfo-funzionali. A carico della colonna vertebrale, il suo allungamento o l'aumentato numero delle vertebre toraciche e lombari o l'allungamento dei corpi vertebrali, hanno causato alterazioni dell'equilibrio tra pressioni che gravano dall'alto e reazioni che provengono da terra modulate dagli

apparati di sospensione dell'animale. Ciò concorre a determinare la "scorrettezza strutturale del suino" (Tarocco 1984), da cui derivano difetti d'appiombo e lesioni agli arti "S.D.A"in alcune linee di Landrace mentre nelle Large White si osserverebbero comportamenti diversi della direzione della colonna da aumento della cifosi a accorciamento del collo ed abbassamento della testa a portamento degli arti "sotto di se". Se a ciò si dovessero aggiungere posizione troppo alta di truogoli e abbeveratoi tali da costringere i suinetti di 35-50 kg ad eccessivo sforzo della colonna vertebrale, sarebbe possibile pervenire ad ipotesi verosimili sulle cause determinanti.
Si auspica pertanto una maggiore attenzione agli studi di statica del suino moderno in fase di realizzazione degli allevamenti ed un ritorno della zoognostica quale riferimento insostituibile nella valutazione dei riproduttori, riconsiderando magari un maggiore equilibrio tra sviluppo muscolare e scheletrico.
Un ulteriore approfondimento del lavoro sara' dedicato ad eseguire ricerche istopatologiche sui tratti del rachide colpiti per meglio comprendere l'istopatogenesi delle lesioni osservate.
Circa gli **ascessi** il loro riscontro, seppur statisticamente poco rilevante, 0,2% della popolazione osservata, riveste notevole importanza sul fronte ispettivo poiché implica il blocco della carcassa al fine di valutare la presenza di ascessi in altre sedi con destinazione alla distruzione o l'assenza di altri ascessi con destinazione a libero consumo previa toelettatura, sequestro e distruzione del segmento di colonna coinvolto, compresa la muscolatura, perdendo così alcuni chilogrammi di tagli nobili. La sede toracica degli ascessi è quasi sempre associata ad ascessi pleurici da *Actinobacillus spp.,* mentre la localizzazione a livello sacro-coccigeo è frequentemente correlata a lesioni necrotiche del moncone coccigeo.

BIBLIOGRAFIA

Corradi A., Alborali L., Passeri B., Salvini F., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P.(2004) "Acquired emivertebrae in "humpy backed" piglets"- Proceding Internat Pig Vet Society, Hamburg, Germany p.357.

Nielsen L.W.D., Hogedal P., Arnbjerg J., Jensen H.E. (2005) "Juvenile kyphosis in pigs. A spontaneous model of Scheuermann's kyphosis" APMIS 113: 702/7.

Lahrmann KH, Hartung K. (1993) "Ursachen kyphotischer und lordotischer Wirbelsaulenverkrummungen mit keilformiger Wirbeldeformation beim Schwein. Berl Munch Tierarztl Wschr. 106:127-32.

Tarocco C. (1984) "La scorrettezza strutturale del suino". Suinicoltura Anno XXV- n.5

Wenger D.R., Frick S.L. (1999) "Scheuermann Kyphosis". Spine 24(24): 2630-2639.

MANIPOLAZIONE DEL GRASSO DIETETICO CON ACIDI GRASSI A MEDIA CATENA: EFFETTI SULLE PRESTAZIONI DEI SUINETTI SVEZZATI

MANIPULATING DIETARY FAT WITH MEDIUM CHAIN FATTY ACIDS: EFFECTS ON WEANED PIGLETS PERFORMANCES

BARICCO GIUSEPPE *, PIOVANO ROBERTO *, MALAVASI CLAUDIO **
** Medico Veterinario Libero Professionista, Torino; ** Biotrade s.n.c., Mirandola (MO)*

Parole chiave: grassi alimentari, acidi grassi, suinetti, prestazioni
Keywords: dietary fats, fatty acids, piglets, performances

Riassunto. Nel presente lavoro un "blend" di acidi grassi a media catena (MCFA, K20, Biotrade s.n.c. Mirandola MO) è stato introdotto nel mangime di suinetti svezzati in sostituzione dello 0,5% dei grassi normalmente aggiunti. Il primo esperimento ha coinvolto 76 + 77 suinetti pesati individualmente nella fase di secondo periodo, dai 15 ai 25 kg di peso vivo, mentre il secondo – di conferma - ha riguardato 93 + 97 suinetti dai 7 ai 22 kg di peso alimentati con un mangime contenente 2500 ppm di ossido di zinco. In entrambe le sperimentazioni l'aggiunta di MCFA al mangime in sostituzione di pari quantità di grassi aggiunti ha prodotto miglioramenti negli I.P.G. nell'ordine del 13% (P<0,01 in exp.1), e contestuali miglioramenti nell'I.C.A. del 7-8%. Si conclude che gli MCFA possono essere dei validi alimenti funzionali nelle diete per suinetti.

Summary. In the present trial a blend of medium chain fatty acids (MCFA, K20, Biotrade s.n.c., Mirandola MO) has been introduced into a feed for piglets in substitution of 0,5% of the fats normally added to the original formula. The first experiment has involved 76+77 piglets weighed individually in the second phase, between 15 and 30 kg of liveweight, while the second – of confirmation – has involved 93+97 piglets between 7 and 22 kg bw, fed with a feed containing 2500 ppm of zinc oxide. In both the experiments the addition of MCFA to the feed in substitution of equal quantities of added fats has produced improvements in ADG of about 13% (P<0,01 in exp.1), and contemporary improvements in FCR of around 7-8%. It is concluded that MCFA can be efficient functional feeds for piglets.

INTRODUZIONE

Gli acidi grassi saturi a media catena (caproico C:6, caprilico C:8, caprico C:10, laurico C:12, e miristico C:14) hanno mostrato in diverse sperimentazioni, *in vivo* ed *in vitro,* interessanti proprietà di tipo antibatterico (*Annamalai et al., Sun et al., Petschow et al.).* In tutti gli animali allevati, ed in particolare nei giovani suini, si è imposta l'esigenza di sostituire l'efficacia degli ormai da lungo tempo banditi antibiotici growth promoters con soluzioni comparabili sul piano dei costi e dell'efficienza, senza dimenticare il variato quadro di apprezzamento del sistema allevamento da parte dei media, il quale

richiede alla filiera delle produzioni animali di limitare al minimo indispensabile il pur necessario ricorso a soluzioni radicali, come i farmaci somministrati nei mangimi sotto prescrizione medica.In questo contesto si sono utilizzati, per fortificare l'efficienza dei sistemi digestivi dei suinetti, additivi appartenenti alla famiglia degli acidi organici, dei probiotici e dei prebiotici, degli estratti di erbe e degli olii essenziali. Tutti efficienti, tutti in varia misura e con diversi gradienti di soddisfazione utilizzati dai produttori.
Meno numerose sono le evidenze sull'uso per gli stessi scopi degli acidi grassi a media catena (MCFA nell'acronimo anglosassone *medium chain fatty acids*): in effetti essi, che in natura si trovano facilmente, come gruppo, nella frazione lipidica del latte – in percentuali differenti a seconda delle diverse specie animali – possono essere recuperati, singolarmente ed industrialmente, da varie fonti lipidiche sia vegetali che animali di costo più contenuto. Il loro valore energetico non è significativamente diverso da quello dei grassi comunemente utilizzati nella formulazione dei mangimi per suinetti (nella quasi totalità strutto o olio di soia), ed è possibile quindi immaginare una manipolazione qualitativa dei lipidi aggiunti ai mangimi per suinetti (per parziale sostituzione degli acidi grassi) al fine di ottenere un grasso che, a pari contributo energetico, apporti un plusvalore efficiente e misurabile di attività antibatterica negli alimenti.

MATERIALI E METODI

Una miscela di MCFA in supporto lipidico, progettata per essere inclusa nei mangimi (K20, Biotrade s.n.c.., Mirandola, MO) è stata introdotta in un mangime commerciale per suinetti di secondo periodo (18,5% P.G., 3400 Kcal D.E.) alla dose di 5 kg /tonnellata, in sostituzione di pari quantità di olio di soia. Il mangime così ottenuto è stato confrontato con un altro lotto, prodotto immediatamente in sequenza al primo, con la formulazione originaria contenente un totale di 30 Kg per tonnellata di olio di soia. Le due formulazioni confrontate erano pertanto in tutto uguali, salvo nella manipolazione dei grassi aggiunti nel lotto MCFA con acidi grassi a media catena.
Questi mangimi sono stati somministrati a due gruppi di suini, omogenei per sesso, peso e conformazione, pesati individualmente a partire dal momento in cui – nell'allevamento sede della prova – si sospende la somministrazione del mangime medicato post-svezzamento, corrispondente ad un peso vivo di circa 15 kg, per un totale di 77 suinetti per i gruppi CTRL e di 76 per i gruppi MCFA.
Si sono misurati:
– Il peso degli animali su base individuale, con elaborazione statistica (ANOVA one way)
– Il consumo di mangime - e di conseguenza l'indice di conversione alimentare – per box (un totale di 6 boxes/gruppo), con elaborazione solo di tipo numerico.
– La mortalità e le patologie eventualmente mostrate dagli animali
La prova ha avuto una durata di 24 giorni.

RISULTATI

I risultati osservati sono stati i seguenti:

Tabella 1. Risultati zootecnici.

	CTRL	MCFA
Peso medio suinetti a D0 kg	15,09 a	16,06 a
Peso medio suinetti a D24 kg	26,78 a	29,26 b
I.P.G. kg.	0,487 a	0,550 b
Consumo di mang./giorno kg	0,900	0,936
I.C.A.	1,85	1,70
Resa del mangime %	54,0%	58,8%

Lettere differenti indicano una differenza statisticamente significativa per P<0,01
(Anova one way, Microsoft Excel)

Nel corso di tutta la prova non si sono avuti episodi di mortalità, e non si sono osservate differenze marcate tra i due gruppi sperimentali nelle manifestazioni patologiche, salvo un aspetto migliore, inteso come lucentezza del pelo, tonicità generale e consistenza media delle feci, per gli animali MCFA rispetto ai controlli.
A scopo di conferma ed in condizioni meno rigorosamente controllate (con i dati disponibili solo sui totali degli animali) la prova è stata ripetuta in un secondo allevamento e con gli stessi principi fondamentali (sostituendo con il blend di MCFA 0,5 kg di olio di soia per quintale di mangime), utilizzando però una base di alimento medicato con 2500 ppm di ossido di zinco (Zincofarm, 0,25%), presente in entrambe le tesi. Questa seconda prova ha riguardato 93 suinetti per il gruppo CTRL e 97 per il gruppo MCFA, per un totale di 39 giorni a partire dallo svezzamento, avvenuto a 28 giorni di vita.
I risultati sono stati i seguenti:

Tabella 2. Risultati zootecnici di verifica.

	CTRL	MCFA
Peso medio suinetti a D0 kg	7,72	7,51
Peso medio suinetti a D21 kg	14,09	14,43
Peso medio suinetti a D39 kg	21,45	23,09
I.P.G. kg. D0/D21	0,303	0,330
I.P.G. kg D21/D39	0,409	0,481
I.P.G. D0/D39	0,352	0,399
Consumo di mang./giorno kg	0,612	0,655
I.C.A.	1,74	1,64
Resa del mangime %	57,5%	61,0%
Scarti/morti	3	3

DISCUSSIONE

In questa duplice esperienza la sostituzione di parte dell'olio di soia presente nella formulazione del mangime con un blend di acidi grassi a media catena in percentuale non superiore allo 0,5% w/w (tale essendo la quantità di prodotto commerciale aggiunto in sostituzione) ha determinato effetti di grande rilevanza su suinetti allevati in condizioni ordinarie tra i 7 ed i 30 kg di peso.

Nella prima prova, un miglioramento nell'accrescimento peso pari al 13% (P<0,01), ed un miglioramento del 9% (numerico) nell'indice di conversione rappresentano un miglioramento globale nell'ordine del 20% rispetto al controllo, che è un risultato ben superiore a quelli normalmente ottenuti con altri additivi sostitutivi dei growth promoter. Occorre inoltre far rilevare come il mangime utilizzato per l'esperimento contenesse una dose normale di acidi organici, e che pertanto il risultato ottenuto in questo esperimento sia da considerare come potenzialmente sommatorio rispetto a quelli derivanti dall'uso degli acidi organici stessi.
Il profumo sgradevole degli MCFA, estremamente intenso sul prodotto ad alta concentrazione, non ha influenzato l'appetibilità dei mangimi, che anzi sono stati consumati in misura leggermente superiore dal gruppo MCFA (+ 4%).
Anche nella seconda prova di conferma i dati relativi all'ìncremento peso (+ 13,3%) ed alla resa alimentare (+6%) si sono dimostrati in armonia con quelli precedentemente osservati, pur considerando che in questo caso i suinetti hanno consumato i mangimi sperimentali fin dal giorno dello svezzamento (peso medio di inizio intorno ai 7,5 kg), e che questi erano medicati con ossido di zinco a causa di una moderata pressione infettiva residenta da *E.coli* presente nell'allevamento.
La presenza del farmaco non ha influenzato l'entità delle risposte ottenute dai MCFA.

CONCLUSIONI

Tra le diverse strategie alimentari disponibili per controllare la flora batterica intestinale degli animali allevati - ed attraverso questa azione di controllo migliorare le prestazioni zootecniche riducendo il consumo di farmaci –, gli acidi grassi a media catena, in dosi e composizioni opportune, possono essere un valido strumento operativo, essendo perfettamente naturali, senza necessità di complicati iter registrativi (sono infatti dei tipici "alimenti funzionali") ed, almeno per quanto si può evincere dai risultati di queste due prime prove, estremamente efficaci sia su mangimi non medicati ma addizionati con i più comuni additivi come gli acidi organici, che su mangimi medicati con principi attivi antisecretori come l'ossido di zinco.
Un ringraziamento alla Az. Agr. Piovano Guido di Airali, Chieri (TO) ed alla Soc. Biotrade snc di Mirandola (MO) per il supporto fornito.

BIBLIOGRAFIA

Annamalai T, Mohan Nair MK, Marek P, Vasudevan P, Schreiber D, Knight R, Hoagland T, Venkitanarayanan K. (2004) "In vitro inactivation of Escherichia coli O157:H7 in bovine rumen fluid by caprylic acid". J Food Prot.;67(5):884-8.

Sun CQ, O'Connor CJ, Roberton AM. (2002) "The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase". Chem Biol Interact.;140(2):185-98.

Petschow BW, Batema RP, Ford LL. (1996) "Susceptibility of Helicobacter pylori to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids". Antimicrob Agents Chemother.;40(2):302-6.

POTASSIO DIFORMATO E SALI DI CALCIO: EFFETTO SULLE PRESTAZIONI DEI SUINI IN SVEZZAMENTO

POTASSIUM DIFORMATE AND CALCIUM SALTS: EFFECTS ON WEANLING PIGLETS PERFORMANCES

COLOMBA DANIELA*, GIRAUDO SILVIA*, BARICCO GIUSEPPE*
** Medico Veterinario Libero Professionista*

Parole chiave: potassio diformato, calcio solfato, calcio carbonato, incremento ponderale
Key words: potassium diformate, calcium sulphate, calcium carbonate, weight gain

Riassunto. E' stata presa in esame la differenza nell'efficacia del potassio diformato (Formi, BASF A.G.) qualora fornito insieme ad una fonte di calcio a reazione acida (solfato di calcio) o antiacida (carbonato di calcio), attraverso l'analisi delle performance zootecniche e sanitarie di suini post svezzamento. Ottantotto suinetti sono stati suddivisi in due gruppi alimentati per 19 giorni con diete identiche, a parte l'addizione dell'una o dell'altra fonte di calcio. Delle eventuali differenze su interventi medicali e stato di salute, indice di diarrea, incremento ponderale ed indice di conversione alimentare si è analizzata la significatività statistica. Il calcio solfato ha ottenuto risultati migliori dal punto di vista delle performance zootecniche; allo stesso modo il miglioramento generale delle prestazioni sanitarie è risultato statisticamente significativo a sfavore del calcio carbonato.

Abstract. Has been examined the difference in efficacy of K diformate (Formi, BASF A.G.) when fed together with a source of calcium with acidic (calcium sulphate) or antacid reaction (calcium carbonate), taking in account the zootechnical performances of weaned piglets, as well as their health status. 88 piglets have been divided in two groups fed for 19 days after weaning with the same diet, differing only in the use of one or another source of calcium. Individual number and type of medical interventions, overall health status, diarrea index, growth rate and feed conversion have been submitted to statistical evaluation. Calcium sulphate achieved globally better results in terms of performances, as well as on healthness parameters, that have been statistically significant.

Introduzione

In seguito al bando, nel 2006, dell'uso di antibiotici come auxinici – a motivo dell'insorgenza di fenomeni di antibiotico resistenza in ambito zootecnico ed umano - veterinari, nutrizionisti e mangimisti si sono impegnati nella sperimentazione di valide alternative.

Numerosi lavori concordano nel rilevare svariati vantaggi nell'utilizzo degli acidi organici nell'alimentazione dei suini in svezzamento, in quanto questi sono in grado di: ridurre il pH gastrico, inibire la crescita microbica nell'alimento e nell'intestino (1, 2, 3, 4, 5, 6,), modulare la durata del transito digestivo (1, 5), stimolare la secrezione di enzimi pancreatici (7), migliorare le performances dei suinetti (8), ritardare il deterioramento enzimatico, fungere da agenti chelanti nei confronti di ioni metallici e ridurre i disordini digestivi nei giovani animali.
Il presente lavoro realizza sul campo una prova nutrizionale, per valutare la congruenza dei risultati pratici con quanto citato in letteratura (9, 10) e per comprendere quali variabili non segnalate entrino in gioco nell'influenzarne l'esito. Lo scopo principale dell'esperimento è stato valutare se vi sia differenza nell'efficacia del potassio diformato qualora fornito insieme ad una sostanza acida (solfato di calcio) o antiacida (carbonato di calcio), attraverso l'analisi delle performances zootecniche di due gruppi di suini in svezzamento.
Lo spunto nasce dalla consultazione di un interessante lavoro italiano presentato al Meeting Annuale SIPAS di Mantova nel 2005, che ha paragonato le caratteristiche del calcio solfato a quelle del calcio formiato, ravvisando come unica significativa differenza degna di nota il costo. Questa considerazione, unita all'attuale non facile reperibilità sul mercato del calcio formiato, il cui comune utilizzo come apportatore di calcio ed acidificante non ha comprovate motivazioni scientifiche, giustifica l'ipotesi di promuovere un maggior impiego del calcio solfato. L'ipotetico effetto negativo causato dall'eccesso di anioni apportati dal calcio solfato, impiegato a dosi elevate, non deve scoraggiare, in quanto l'eventuale associazione con il potassio diformato (composto per il 30% di catione potassio) contrasta efficacemente codesto squilibrio elettrolitico (11).
Oltre all'interesse puramente scientifico, una prova di campo di questo tipo può essere utile all'allevatore per valutare i margini di un eventuale risparmio economico, rispetto ad investimenti nutrizionali inutili in sostanze dal costo superiore, non garanti nella pratica di risultati significativamente migliori. E' d'altro canto intuitivo comprendere come non abbia molto senso investire denaro in acidificanti per mangimi al contempo addizionati di altre sostanze in grado di inattivarle, attraverso elementari reazioni chimiche.
Nello studio effettuato, relativamente ai risultati forniti dai suinetti sottoposti alle due differenti diete, si è poi analizzata la significatività di eventuali differenze su interventi medicali e stato di salute, incremento ponderale ed indice di conversione alimentare, indice di diarrea e di trattamento.

Materiali e metodi

E' stata condotta una prova nutrizionale su ottantotto suinetti ibridi commerciali, simili per caratteristiche parentali, divisi allo svezzamento (21/22 gg.), in due gruppi da quarantaquattro soggetti ciascuno, stabulati per figliata in otto box, senza successivi rimescolamenti. I due gruppi sono identificati con il nome della dieta seguita.

La sala svezzamento utilizzata, parzialmente condivisa con suinetti trasferiti la settimana precedente e successiva; era sita ad inizio capannone, con la fila perimetrale occupata dai soggetti del gruppo solfato (confinanti con suinetti più vecchi), quella interna dai soggetti del gruppo carbonato (solo nell'ultima settimana confinanti con suinetti più giovani).
Dopo nove giorni di alimentazione con mangime prestarter, per l'intera durata della prova (19 giorni) un gruppo ha assunto la dieta "solfato", addizionata di calcio solfato 1,15%, potassio diformato (Formi™ BASF A.G.) 1,5%, fosfato monocalcico 0,5%, cloruro di sodio 0,25%, l'altro la dieta "carbonato" del tutto identica a parte l'addizione di calcio carbonato 1,15%. Entrambi i regimi alimentari contenevano inoltre: 0,1% di dolcificante (Luctaron®), 120 ppm di tilosina, 120 ppm di sulfametazina e 600 ppm di ossitetraciclina (tabella 1). L'alimento è stato fornito due volte al giorno, garantendo libero accesso ad acqua fresca di abbeverata.
Eventuali trattamenti antibiotici aggiuntivi sono stati di volta in volta segnalati.

Tabella 1. Composizione % delle due diete

	CALCIO SOLFATO	CALCIO CARBONATO
Orzo decorticato fiocchi	24	24
Mais nazionale farina	20	20
Soia farina estrazione 44%	15	15
Orzo 6 ranghi	14,9	14,9
Latte 32-21%	6	6
Crusca tenera fine	6	6
Aringhe 49,5% PG	6	6
Siero scremato acido	2,5	2,5
Formitec	1,5	1,5
Strutto	1	1
54962787 Mlf 1%	1	1
Fosfato monocalcico	0,5	0,5
Sodio cloruro	0,25	0,25
L-lisina HCl	0,2	0,2
Metionina DL	0	0
$CaSO_4$	1,15	0
$CaCO_3$	0	1,15

Sono state effettuate le seguenti registrazioni sui suinetti:
– giorno 0: pesata individuale con bilancia elettronica ed apposizione marchio auricolare
– quotidianamente: stato di salute (trattamenti e mortalità) ed indice di diarrea (presenza/assenza) individuali
– giorni 5, 10, 15, 19: consumo di mangime per box, necroscopie (con registrazione del peso corporeo al decesso)
– giorno 19: peso individuale finale.
La prova nutrizionale è stata realizzata fra Gennaio e Febbraio 2007.

Risultati

La tabella 2 schematizza il diario della prova nutrizionale.

Tabella 2. Diario della prova nutrizionale

giorno	data	osservazioni
-9	10-gen	svezzamento
0	19-gen	inizio prova: marchio auricolare e pesata individuale iniziale ernia ombelicale suinetto 28
1	20-gen	
2	21-gen	
3	22-gen	distacco marchio auricolare suinetto 26
4	23-gen	
5	24-gen	controllo consumo mangime per box
6	25-gen	tatuaggio Consorzio Prosciutto Parma
7	26-gen	inizio tosse box 3 e 4 (sintomatologia presente fino a fine prova) inizio diarrea box 4 / 5 / 7 / 8 (sintomatologia presente fino al giorno 10)
8	27-gen	inizio trattamento box 5: enrofloxacin 5% 0,5 ml SID (fine terapia giorno 10)
9	28-gen	
10	29-gen	controllo consumo mangime per box
11	30-gen	
12	31-gen	
13	1-feb	inizio zoppia suinetto 70 (fino a fine prova)
14	2-feb	
15	3-feb	controllo consumo mangime per box
16	4-feb	2° vaccinazione per Mycoplasma
17	5-feb	n° 2 necroscopie su soggetti morti (suinetti 24 e 87)
18	6-feb	
19	7-feb	calcolo consumo totale mangime per box e pesata individuale finale

I valori ottenuti sono stati testati mediante analisi della varianza per dati indipendenti. La probabilità di manifestare diarrea nei due gruppi di suinetti considerati è stata poi testata con il Test Esatto di Fisher. Per tutti i risultati è stato considerato statisticamente significativo un valore di $p \leq 0,05$. Le analisi statistiche sono state condotte usando il software Rv. 1.2.0.
La figura 1 riassume i dati ponderali e gli eventi più significativi relativamente ai due gruppi di suinetti; segnalando in particolare i soggetti con sintomatologia respiratoria e/o enterica, zoppia, morte improvvisa.

Performance di crescita
Si riportano nella tabella 3 i parametri produttivi medi relativi ai due gruppi di suinetti, ottenuti a partire dai risultati finali di crescita e di consumo in mangime dividendoli per i giorni di sperimentazione.

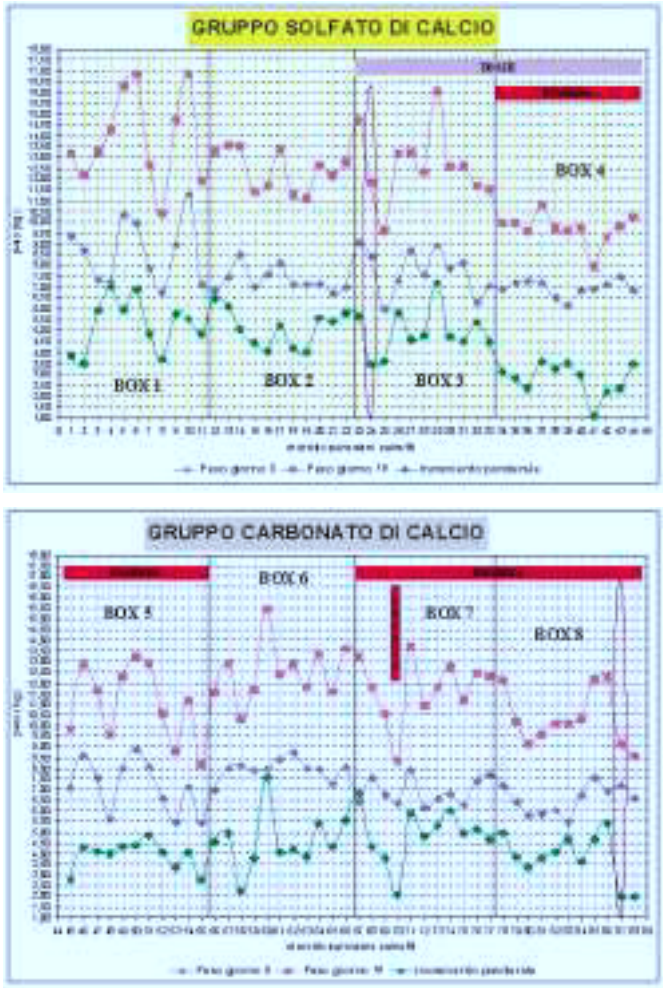


Fig. 1. Grafico relativo ai dati ponderali individuali (con gli eventi patologici rilevanti) nei due gruppi

Tabella 3. Confronto fra performance nei due gruppi

	Dieta $CaSO_4$ 44 suinetti	Dieta $CaCO_3$ 44 suinetti
Parametro considerato:		
Peso medio al giorno 0 (kg)	7,65	7,10
Peso medio al giorno 19 (kg)	12,14	11,37
Incremento ponderale giornaliero (g)	237,05	225,36
Incremento ponderale totale (kg)	197,70	187,90
Consumo giornaliero di alimento (g)	441,97	393,17
Consumo totale di alimento (kg)	368,60	327,90
Indice di conversione alimentare (ICA)	1,86	1,74

L'incremento ponderale giornaliero dei suini alimentati con la dieta solfato è stato lievemente maggiore, anche se non statisticamente significativo (p=0,41), rispetto a quello dei suini alimentati con la dieta carbonato (in media 237 g/die contro 225 g/die), così come il consumo di alimento giornaliero (442 g/die contro 393 g/die). L'indice di conversione alimentare ottenuto (rispettivamente 1,86 e 1,74) indica che la resa del mangime integrato con calcio carbonato è stata lievemente superiore a quella del mangime integrato con calcio solfato; questa discrepanza non è tuttavia analizzabile statisticamente (consumo di mangime calcolato per box, e non singolarmente). Emerge quindi come nel gruppo solfato ad un minimo incremento ponderale giornaliero corrisponda un discreto incremento di consumo alimentare, con conseguente lieve peggioramento dell'indice di conversione non valutabile statisticamente. Ciò porterebbe a pensare che il suo impiego non dia un vantaggio produttivo; i risultati andrebbero però rivalutati alla luce delle cause non matematiche presenti all'interno dell'allevamento (patologie concomitanti) che potrebbero aver limitato l'azione dei due sali utilizzati.
Analizzando gli stessi parametri solo relativamente ai suini **sani** (asintomatici) lo studio si restringe a 22 soggetti (box 1 e 2) del gruppo solfato e ad 11 soggetti (box 6) del gruppo carbonato. L'incremento ponderale giornaliero del gruppo solfato è stato 272 g/die contro 255 g/die del gruppo carbonato (differenza non statisticamente significativa, con p=0,44). Anche il consumo di alimento del gruppo solfato è stato sensibilmente maggiore (491 g/die contro 397 g/die). I relativi indici di conversione alimentare (rispettivamente 1,81 e 1,56) non sono valutabili statisticamente. La tabella 4 riassume quanto descritto.

Tab. 4. Confronto fra performance dei suinetti sani appartenenti ai due gruppi

	Dieta $CaSO_4$ 22 suinetti SANI	Dieta $CaCO_3$ 11 suinetti SANI
Parametro considerato:		
Incremento ponderale giornaliero (g)	271,77	254,78
Incremento ponderale medio (kg)	5,16	4,84
Consumo giornaliero di alimento (g)	490,67	397,13
Indice di conversione alimentare (ICA)	1,81	1,56

Analizzando gli stessi dati relativamente ai soli suini **malati**, lo studio si concentra su 22 soggetti (box 3 e 4) per quanto riguarda il gruppo solfato e 33 soggetti (box 5, 7 e 8) per quanto riguarda il gruppo carbonato. L'incremento ponderale giornaliero del gruppo solfato è stato di 202 g/die contro 215 g/die del gruppo carbonato (differenza non significativa, con p=0,45). Con un consumo giornaliero di alimento quasi identico (circa 392 g/die), ne consegue che gli indici di conversione alimentare sono stati rispettivamente 1,94 e 1,82 (differenza non statisticamente valutabile). La tabella 5 riassume quanto descritto.

Tab. 5. Confronto fra performance dei suinetti malati appartenenti ai due gruppi

	Dieta $CaSO_4$ 22 suinetti MALATI	Dieta $CaCO_3$ 33 suinetti MALATI
Parametro considerato:	CaSO4	CaCO3
Incremento ponderale giornaliero (g)	202,15	215,20
Incremento ponderale medio (kg)	3,82	4,08
Consumo giornaliero di alimento (g)	393,03	391,84
‚Indice di conversione alimentare (ICA)	1,94	1,82

Scorporando ulteriormente i dati emerge che, mentre nel gruppo carbonato la malattia non ha influito sui risultati, se non in forma lieve (p=0,5), nel gruppo solfato le performance di crescita, il consumo di alimento e l'indice di conversione sono stati molto differenti tra sani e malati, fino a raggiungere un'alta significatività statistica (p=0,0009).

Considerando le patologie manifestatesi, si può notare che, mentre nel gruppo carbonato ci sono stati solo episodi di diarrea, nel gruppo solfato, oltre alla diarrea (durata 3 giorni come nell'altro gruppo) si è avuta tosse in due box, dal giorno 7 a fine prova. Questo fa supporre che la **tosse** sia stato un fattore di disturbo molto importante. Infatti, valutando separatamente la tosse dalla diarrea, relativamente al gruppo solfato i risultati si trasformino nei seguenti. Fra i 44 soggetti, di cui 22 hanno manifestato sintomi respiratori (box 3 e 4) e 22 sono rimasti sani (box 1 e 2), l'incremento ponderale giornaliero del gruppo dei sani risulta essere 272 g/die contro 202 g/die del gruppo dei malati; questa differenza è altamente significativa, con p=0,0009. Il consumo di alimento dei suini sani è stato lievemente maggiore rispetto ai malati (491 g/die contro 393 g/die). Ne consegue che gli indici di conversione alimentare sono stati rispettivamente 1,81 e 1,94, con un lieve aumento fra i malati non calcolabile statisticamente. L'evidenza grafica di quanto affermato risulta dall'osservazione congiunta delle tabelle 4 e 5.

Interessante è poi confrontare, sempre nel gruppo solfato, performance di crescita, consumo alimentare ed indice di conversione degli 11 suinetti con sola tosse (box 3) rispetto agli 11 suinetti con insieme tosse e diarrea (box 4); l'alta significatività statistica del risultato (p=0,00002) ipotizza un effetto additivo aggravante legato alla copresenza delle due patologie. La tabella 6 illustra tale situazione.

Tab. 6. Confronto fra performance dei suinetti malati appartenenti nel gruppo solfato

	Dieta $CaSO_4$	
	11 suinetti TOSSE	11 suinetti TOSSE+DIARREA
Parametro considerato:		
Incremento ponderale giornaliero (g)	260,05	144,26
Incremento ponderale medio (kg)	4,90	2,74
Consumo giornaliero di alimento (g)	518,36	364,11
Indice di conversione alimentare (ICA)	1,99	2,52

Valutiamo infine l'influenza della patologia enterica nei due gruppi. Maggiore crescita e migliore resa alimentare sono state riscontrate fra i 33 suini con **diarrea** del gruppo carbonato (box 5, 7, 8) rispetto agli 11 del gruppo solfato (box 4), con un'alta significatività statistica (p=0,0005). Fra i fattori in gioco sicuramente il trattamento terapeutico selettivo da un lato e la copresenza di patologie diverse dall'altro. Nella tabella 7 riportiamo i dati relativi a questo ultimo confronto.

Tab. 7. Confronto fra performance dei suinetti non diarrea appartenenti ai due gruppi

	Dieta $CaSO_4$ 11 suinetti DIARREA+TOSSE	Dieta $CaCO_3$ 33 suinetti DIARREA
Parametro considerato:	CaSO4	CaCO3
Incremento ponderale giornaliero (g)	144,26	215,20
Incremento ponderale medio (kg)	2,74	4,08
Consumo giornaliero di alimento (g)	364,11	391,84
Indice di conversione alimentare (ICA)	2,52	1,82

Indice di diarrea

A partire dal giorno 7 è comparsa sintomatologia enterica, con diarrea più o meno grave, di consistenza cremosa, colore brunastro, che si è diffusa rapidamente fra i suinetti dei due gruppi, ma soprattutto fra quelli sottoposti a dieta con carbonato di calcio.
In base ai dati numerici dei soggetti diarroici distribuiti fra i diversi box, è possibile calcolare l'indice di diarrea, applicando la seguente formula:

$$\text{I.D.} = \frac{\text{N° soggetti giornalmente malati}}{\text{N° presenze animali}} = \frac{\text{N° animali x giorni di malattia}}{\text{N° animali x giorni di permanenza}}$$

Questo valore risulta essere 0,04 nel gruppo solfato e 0,12 nel gruppo carbonato.
Applicando ai nostri risultati, relativi alla proporzione di suinetti appartenenti ai due gruppi rispettivamente sani e malati, il Test Esatto di Fischer, si può affermare che i soggetti alimentati con calcio solfato hanno un indice di diarrea significativamente inferiore a quelli del gruppo alimentato con calcio carbonato (p<0,001). In altre parole la differenza osservata nella proporzione di suinetti con diarrea fra i due gruppi non può spiegarsi come effetto del caso o della fluttuazione del campionamento.
L'Odds Ratio è 20, il che sta a significare che i suinetti alimentati con calcio solfato hanno avuto una probabilità 20 volte inferiore rispetto a quelli alimentati con calcio carbonato di manifestare diarrea (p=0,001).

Indice dei trattamenti

Manifestando i suinetti del box 5 anoressia grave e scariche profuse, solo su questi è stata introdotta terapia antibiotica con enrofloxacin 0,5% alla dose di 0,5 ml/suino SID, per 3 giorni. Al giorno 10 la forma enterica si è risolta.

In base ai dati a disposizione è possibile calcolare l'indice dei trattamenti per i due gruppi di animali, applicando la seguente formula:

$$\text{I.T.} = \frac{\text{N° interventi individuali}}{\text{N° presenze animali}} = \frac{\text{N° animali x giorni di trattamento}}{\text{N° animali x giorni di permanenza}}$$

L'indice dei trattamenti dei soggetti del gruppo solfato risulta zero, mentre quello del gruppo carbonato è 0,04. E' ovvio l'aumento dell'indice di trattamento nel gruppo carbonato, rispetto a quello solfato, perché l'intervento terapeutico ha interessato solo i soggetti con peggiore evoluzione del disturbo enterico.

Discussione

Guardando alla nostra prova nella sua globalità, è accertato che il calcio solfato nella nostra dieta per suinetti post svezzamento ha sortito risultati statisticamente migliori dal punto di vista delle performance zootecniche rispetto al calcio carbonato. C'è stato un aumento matematico di circa il 5% nell'incremento di peso giornaliero medio, desumibile dai pesi individuali, ma ciò non raggiunge la significatività statistica. Allo stesso modo va valutato il maggior consumo alimentare del gruppo, che ha finito per portare ad un peggioramento della resa del mangime di circa il 7%. Il bilancio dei risultati è quindi equivalente. Parallelamente, a fronte di incrementi ponderali e consumi alimentari inferiori, il gruppo integrato con il carbonato di calcio ha prodotto una migliore resa dell'alimento, dal puro interesse matematico.
Il consumo di alimento non molto difforme fra le due diete non permette di desumere una loro differente appetibilità ed il ventilato debole effetto lassativo del calcio solfato, peraltro non noto a percentuali di inclusione così basse, non si è realizzato, anzi il suo utilizzo ha in qualche modo difeso il gruppo da disturbi enterici, come dimostrato dal minore indice di diarrea e dal minor indice dei trattamenti. Seppur sia difficile correlare dieta e trattamento, essendo stato trattato un solo box, è infatti ipotizzabile un superiore effetto protettivo del calcio solfato rispetto al calcio carbonato, a motivo di una maggiore frequenza e gravità dei sintomi fra i soggetti appartenenti a questo ultimo gruppo, documentabile in base ai dati sull'indice dei trattamenti.
La variabilità individuale dei diversi parametri considerati è stata notevole in ambo i gruppi. In campo agiscono fattori non matematicamente prevedibili e statisticamente analizzabili che limitano la corrispondenza causa-effetto dei diversi approcci alimentari. Assegnare un valore maggiore ai limiti produttivi derivanti da patologie respiratorie rispetto a quelli da patologie enteriche sembra valido in questo studio, visti i dati relativi allo scorporo dei risultati fra malati e sani, ma non è generalizzabile. Abbiamo dimostrato come, concentrando la nostra attenzione ai soli soggetti sani (totalmente asintomatici per l'intera durata della prova), siano migliori le performances indotte dall'assunzione di calcio solfato, che raggiungono in questo caso persino la significati-

vità statistica. Al contempo, nel gruppo solfato la tosse ha limitato il consumo di alimento e l'incremento ponderale medio, in modo statisticamente significativo, molto più di quanto l'abbia fatto la diarrea nel gruppo carbonato, probabilmente a motivo di una persistenza maggiore dei sintomi. La diarrea da sola, di qualunque eziologia, non comporta necessariamente una diminuzione marcata di appetito, cosa che è più intuitivo credere avvenga con difficoltà respiratorie.
I dati sulla mortalità non si sono rilevati difformi dalle attese, con un lieve miglioramento relativo alla percentuale di scarti, prima della messa a terra.
A confondere ulteriormente il quadro emerso hanno concorso le condizioni climatiche altamente instabili, verificatesi nel periodo della prova, peraltro realizzata in una struttura datata, senza adeguata coibentazione. Il gruppo solfato era ospitato infatti nella zona perimetrale del capannone, sicuramente meno controllabile termicamente.
Altro fattore influente è stata la condivisione della sala svezzamento con soggetti di età diverse, potenzialmente pericolosi a livello di trasmissione di malattie.
In base alla difficoltà di reperimento sul mercato del calcio formiato, il calcio solfato si è dimostrato almeno in questo caso una valida alternativa, efficace nel ridurre il potere tampone della dieta, anche in considerazione del costo notevolmente inferiore. E' però impossibile per noi misurare, con ragionevolezza, quale sia la sua reale capacità di acidificare la dieta, dal momento che l'analisi bromatologica effettuata non ha documentato significative differenze nel potere tampone rispetto al carbonato.
Una scelta nutrizionale fra solfato e carbonato non è al momento motivabile con certezza in base ai risultati ottenuti; l'indicazione verso la preferenza teorica del solfato andrebbe suffragata da ulteriori prove, se possibile, riducendo il numero delle variabili in gioco.

Conclusioni

Sostituendo semplicemente, in un mangime da svezzamento per suinetti additivato con un prodotto acidificante (potassio diformato), un apportatore di calcio con reazione acida come il calcio solfato al tradizionale calcio carbonato, a reazione fortemente basica, la lettura dei dati di prestazione e sanitari mostra qualche interessante spunto di riflessione.
Sicuramente si ha un generale miglioramento delle prestazioni sanitarie (indice di diarrea ed indice dei trattamenti individuali inferiori) statisticamente significativo.
E' altresì ipotizzabile un miglioramento tendenziale delle prestazioni produttive, con maggiori incrementi ponderali giornalieri e consumi di alimento, statisticamente significativi soprattutto fra i soggetti asintomatici, esenti da importanti interferenze da parte di patogeni respiratori o enterici. In questi ultimi anche la resa del mangime contenete calcio solfato è superiore, forse per il maggiore potere acidificante.
Ulteriori approfondimenti sono tuttavia richiesti in situazioni di campo, per quantificarne i reali vantaggi.

Bibliografia

Straw M.L., Kornegay E.T., Evans J.L., Wood C.M., (1991), Effects of dietary pH and phosphorus source on performance, gastrointestinal tract digesta, and bone measurements of wealing pigs, J. Anim. Sci., 69:4496-4504.

Fuller R., (1977), The importance of lattobacilli in maintaining normal microbial balace in the crop, *British Poultry Science*, 18: 8-94

Lueck E., (1980), Antimicrobial food additives: Characteristics, uses, effects, *Springer-verlag*, Berlin, Germany

Mroz, Z. (2003). Organic Acids of various origin and physico-chemical forms as potential alternative sto antibiotic growth promoters for pigs. *In: Proceeding of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. 1: 267-293. Banff, AB, Canada

Walsh M.C., Peddireddi L., Radcliffe J.S., 2004, Acidification of Nursery Diets and the Role of Diet Buffering Capacity, Proceedings, Midwest Swine Nutrition Conference

Roth F. X., Kirchgessner M. (1997), Formic acids as a feed additive for piglets: Nutritional and gastrointestinal effects, In J.P. Laplace, C. Fevrier, and A. Barbeau (eds) *Proceeding of the 7thInternational Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Saint Malo, France*, pp.498-501.

Sano H, Akamaura E.H., Takahashi H, Terashima Y., (1995), Plasma insulin and glucagon responses to acute challenges of acetate, propionate, n-butyrate and glucose in growing gilts (sus scofa), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110°: 375-378

Boling S.D., Webel D.M., Mavromichalis I, Parsons C.M., Baker D.H., (2000), The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs, *Journal of Animal Science*, 78:682-689.

Mroz Z., Reese D.E., ?verland M., van Diepen J.T.M., Kogut J., (2002), The effects of potassium diformate and its molecular constituents on the apparent ileal and fecal digestibility and retention of nutrients in growing finishing pigs, *Journal of Animal Science*, 80:681-690

Biagi G., Piva A., Hill T., Schneider D.K., Crenshaw T.D., (2003). Low buffering capacity diets whit added organic acid as a substitute for antibiotics in diets for weaned pigs, *Digestive Physiology in Pig, Proc. 9th Symposium*, 217-219.

Baricco G., Ancordi M., (2005), Potenziale antiacido di ingredienti comuni ed inusuali per la mineralizzazione dei mangimi per suinetti: risultati di un test di laboratorio, *Atti del XXXI Meeting Annuale della SIPAS*, 159-166

MARCATORI ANATOMO-PATOLOGICI INDOTTI DALL'USO ILLEGALE DELLA RACTOPAMINA NEI SUINI: STUDIO PRELIMINARE

PATHOLOGICAL MARKERS OF ILLEGAL USE OF RACTOPAMINE IN PIGS: PRELIMINARY DATA

DEBORAH CATALANO, STEFANO AMEDEO, CLAUDIO BELLINO, ANTONIO D'ANGELO, FRANCO GUARDA, GIOVANNI PERONA*, PAOLO POLLICINO, PAOLO SAVARINO, RENATO ZANATTA, MARIA TERESA CAPUCCHIO
*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095, Grugliasco (Torino); * CISRA, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095, Grugliasco (Torino)*

Parole chiave: Suini, ractopamina, patologia
Key words: Pigs, ractopamine, pathology

Riassunto. L'incremento ponderale dei suini può essere realizzato somministrando fraudolentemente molecole che vanno ad influenzare l'equilibrio ormonale. La ractopamina è un b agonista utilizzato da alcuni anni in numerosi Paesi del mondo che sembra portare ottimi vantaggi sulla qualità delle carcasse.
Tale lavoro ha voluto studiare le lesioni anatomo-patologiche, ultrastrutturali e biomolecolari indotte dalla ractopamina a diversi dosaggi nella specie suina al fine di sviluppare dei biomarcatori utili per denunciare l'uso illegale di questa sostanza. Disponendo di informazioni precise sulle lesioni provocate dall'uso della ractopamina nella tipologia di suini più comunemente allevati si potrà attivare un piano di sorveglianza nei macelli di suini tutelando pertanto la salute del consumatore.

Abstract. The increase of muscle mass in large animals could be obtained giving different prohibited drugs that alter the hormonal balance. Ractopamine is a member of the class of drugs called b agonists, which have powerfull desiderable and undesiderable effects. Ractopamine has the ability to increase muscle mass and residues in tissue of treated animals but can cause symptoms of acute poisoning in people. This paper has studied the histo-pathological and ultrastructural lesions due to the illegal use of ractopamine in pigs to consider them as biomarkers. The observed pathological features will be used to activate a prophilaxis plan in the slaughterhouses of pigs to prevent the consumers health.

Introduzione

La crescita degli animali in produzione zootecnica può essere incrementata somministrando molecole che influenzano, direttamente o indirettamente, l'equilibrio ormonale attraverso una "manipolazione endocrina". Queste molecole possono essere suddivise

in tre categorie: sostanze ad azione antiormonale (tireostatici), ormoni sessuali naturali e sintetici, agenti di ripartizione (β-agonisti) e fattori di crescita propriamente detti (antibiotici). Attualmente la tendenza è quella di somministrare "cocktail" di vari principi attivi con il duplice vantaggio di sfruttare al meglio le caratteristiche anabolizzanti delle singole molecole attenuando i possibili effetti collaterali sfavorevoli e riducendo sensibilmente le possibilità diagnostiche sia dal punto di vista istologico sia da quello chimico.

Tra le categorie di sostanze prima elencate una posizione importante è oggi occupata dai β-agonisti, farmaci broncodilatatori e tocolitici regolarmente registrati per uso veterinario che vengono impiegati come auxinici da soli oppure in associazione con altri anabolizzanti e con i corticosteroidi a dosi da 5 a 25 volte superiori a quelle terapeutiche. Essi agiscono sui recettori fisiologicamente presenti in diversi organi ed in particolare a livello delle cellule muscolari scheletriche promuovendo la glicogenolisi e a livello degli adipociti favorendo la degradazione dei lipidi. Ciò comporta l'aumento della sintesi di proteine strutturali a scapito della biosintesi lipidica determinando il fenomeno noto come "*effetto di ripartizione*" che permette di indirizzare tutta l'energia proveniente dalla lipolisi e dall'alimentazione verso l'aumento della massa muscolare. L'isoprotenerolo è stata la prima molecola sintetizzata per stimolare i β-recettori. Essa agisce allo stesso modo sia sui recettori di tipo β_1 sia su quelli di tipo β_2. Per questo motivo, gli effetti positivi, fra cui il rilassamento della muscolatura liscia bronchiale, sono accompagnati da effetti collaterali spiacevoli, quali aumento della frequenza cardiaca e ipotensione. Per ovviare a questi inconvenienti, sono state sintetizzate molecole capaci di interagire prevalentemente con i β_2-recettori in modo tale da ridurre al minimo gli effetti collaterali non desiderati. Tra queste ricordiamo il clenbuterolo, che è un agonista β-adrenergico parziale (agisce cioè prevalentemente sui β_2-recettori) in grado di superare la barriera emato-encefalica. La risposta cellulare indotta dall'attivazione dei recettori adrenergici è molto cellulo-specifica e perciò estremamente varia. Tutti i recettori di tipo b mediano, all'interno della cellula bersaglio, un aumento dell'attività dell'adenilatociclasi, e quindi della concentrazione di cAMP che attiva diversi pathways citoplasmatici biochimici e di regolazione dell'espressione genica.

A causa di episodi di intossicazione acuta (tachicardia, nervosismo, tremori, vertigini) verificatisi in Spagna (1990) e in Francia (1991) per l'ingestione di residui tossici di clenbuterolo (0.375-0.5 microgr/g) accumulati nel fegato di bovini trattati destinati all'alimentazione umana, dal 1996 l'uso di tutti i β-agonisti è stato vietato in Europa per tutte le specie in produzione zootecnica. Ne è prevista la sola somministrazione ad uso terapeutico nel cavallo per l'azione broncodilatatrice e nella vacca gravida in caso di minaccia di aborto, parto prematuro o distocico in virtù della loro proprietà tocolitica per gli effetti rilassanti indotti sulla muscolatura liscia uterina (Kuiper et al, 1998). Al fine di rilevare l'uso fraudolento di tali sostanze, nel 2001 si è costituito in collaborazione con la Regione Piemonte, l'Osservatorio Regionale per le Alterazioni Patologiche (O.R.A.P.) con sede presso il Dipartimento di Patologia Animale. L'obiettivo dell'osservatorio è studiare le lesioni anatomo-patologiche e biomolecolari indotte dalle diverse sostanze anabolizzanti nei bovini. Riguardo la specie suina è degno di nota un β-agonista relativamente nuovo, la ractopamina, autorizzato dalla FDA negli Stati Uni-

ti dal 2000 ed in altri 22 Paesi del mondo, che sembra portare ottimi vantaggi sulla qualità delle carcasse.
Attualmente si ritiene aumentato il rischio sanitario legato al consumo di carni in seguito all'utilizzo fraudolento di sostanze "promotori di crescita" anche nel patrimonio suinicolo. Scopo della presente ricerca è stato pertanto estendere i controlli non solo alla specie bovina, ma anche a quella suina. In collaborazione con l'ORAP tale ricerca ha voluto studiare le lesioni anatomo-patologiche, ultrastrutturali e biomolecolari indotte dalla ractopamina a diversi dosaggi nella specie suina al fine di sviluppare dei biomarcatori utili per denunciare l'uso illegale di questa sostanza e tutelare pertanto la salute del consumatore. Disponendo di informazioni precise sulle lesioni provocate dall'uso della ractopamina nella tipologia di suini più comunemente allevati in Piemonte si potrà attivare un piano di sorveglianza sugli allevamenti di suini della regione tutelando pertanto il consumatore.

Materiali e metodi

E' stata allestita una sperimentazione utilizzando n° 4 gruppi di suini di 110-120 kg (fase di finissaggio) trattati con diversi dosaggi di ractopamina. Ogni gruppo era composto da ugual numero di femmine e di maschi ed è stato sottoposto a sperimentazione per 5 settimane fino a raggiungimento di un peso di 140 Kg circa presso l'azienda CISRA di Grugliasco.
Il primo gruppo, di controllo costituito da n° 6 suini, è stato alimentato con una dieta standard priva di alcuna sostanza auxinica. Il secondo gruppo (n° 8 suini) è stato alimentato con una dieta standard integrata con 10 mg/kg/die [ppm] di ractopamina idrocloride, dose corrispondente al limite minimo di utilizzo ove la ractopamina è autorizzata. Il terzo gruppo (n° 8 suini) è stato alimentato con una dieta standard integrata con un eccesso di ractopamina idrocloride (20 mg/kg/die [ppm]), dose corrispondente al limite massimo dei trattamenti effettuati ove la ractopamina è autorizzata. Il quarto gruppo (n° 8 suini) è stato alimentato con una dieta standard integrata con un notevole eccesso di ractopamina idrocloride pari a 40 mg/kg/die [ppm]. Tutti gli animali, prima dell'inizio della sperimentazione, sono stati pesati, sottoposti a prelievo di campioni di sangue ed urina e ad indagini eco-elettrocardiografiche. Durante la sperimentazione gli animali sono stati pesati ogni 7 giorni per valutare l'incremento ponderale e sono stati frequentemente monitorati per valutare la comparsa di eventuali alterazioni comportamentali e della funzionalità cardiaca (aumento di frequenza e gittata cardiaca) descritte in associazione ad iperdosaggi della ractopamina (Marchant-Forde et al, 2003).
Al termine delle 5 settimane gli animali sono stati pesati, sottoposti a prelievi di sangue, urina, liquido cerebro-spinale (CSF) e ad indagini eco-elettrocardiografiche per la valutazione delle eventuali alterazioni cardiache indotte dalla sperimentazione. Gli animali sono stati quindi sacrificati e sottoposti al prelievo di organi bersaglio delle principali sostanze promotrici di crescita con particolare riferimento alla ractopamina per le valutazioni macroscopiche, istologiche ed ultrastrutturali. Il gruppo di controllo

ha fornito un archivio di tutti gli organi sicuramente privi di lesioni indotte dalla ractopamina. Complessivamente sono stati campionati i seguenti organi: cute, grasso, muscolo (longissimus dorsi), encefalo ed ipofisi, occhio, cuore e arco aortico, polmone, tiroide, timo, trachea, esofago, stomaco, piccolo e grosso intestino, fegato, rene, linfonodi meseraici, milza, prostata, ovaio, utero e mammella.
Al fine di valutare la presenza di residui sono stati prelevati per determinazioni analitiche campioni di urina, fegato, rene, polmone, muscolo ed encefalo.
Anche campioni di liquido cerebro-spinale sono stati raccolti per la ricerca dei residui indice della capacità della molecola di passare la barriera emato-encefalica, tale da giustificare le alterazioni comportamentali.
I campioni di tessuto degli animali sono stati prelevati in triplo per le indagini istologiche, ultrastrutturali e biomolecolari. Per la microscopia ottica, i tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati e colorati con ematossilina-eosina. Campioni di fegato di tutti gli animali sperimentali sono stati anche fissati in alcool e successivamente inclusi in paraffina al fine di preservare l'eventuale glicogeno ivi presente.
Al momento solo i campioni di fegato, cuore e muscolo sono stati fissati in glutaraldeide 2.5%, disidratati con acetone ed inclusi in resina Spurr per le indagini ultrastrutturali. I tessuti da destinare alle ricerche biomolecolari sono stati stoccati a –80°C.
Le alterazioni dei parametri macroscopici ed istologici sono state registrate mediante la compilazione di schede diagnostiche che, inserite in un data base, permetteranno la classificazione dei soggetti trattati.

Risultati

Attualmente la sperimentazione è stata completata, ma i risultati disponibili sono preliminari e relativi solo ad una parte degli animali trattati. Sono rappresentati dai reperti macroscopici complessivi e dai reperti istologici parziali (circa 50% dei campioni). Ancora non sono disponibili i risultati delle indagini ultrastrutturali e biomolecolari.
Clinicamente la valutazione degli esami cardiologici è ancora da completare. Sono stati osservati un aumentato nervosismo ed un aumento di appetito in alcuni soggetti trattati, ma il dato necessita una più attenta valutazione esaminando le schede comportamentali predisposte. I soggetti trattati con iperdosaggio sono invece parsi molto meno reattivi agli stimoli soprattutto nell'ultimo periodo. Lo stesso appetito era diminuito benchè i consumi di alimento, in questa categoria fossero inferiori rispetto alle altre ed ai controlli non trattati. L'indice di conversione alimentare, analogamente a quanto riportato in letteratura, è pertanto risultato migliorato con diminuzione del senso di appetito per azione sui b_2-AR presenti a livello centrale e per effetto di ripartizione: a parità di quantità di razione alimentare assunta è quindi risultata migliore la resa in carne.
La valutazione degli esami ematologici, degli esami del CSF e dei residui non è ancora stata completata.

Macroscopicamente ed istologicamente non sono state evidenziate alterazioni a livello di cute, tessuto adiposo, milza, ghiandola surrenale, ovaie, utero, trachea, esofago, tonsille, timo, encefalo, ipofisi e occhio.
L'esame macroscopico del cuore ha rilevato, in tutti i soggetti trattati, ipertrofia del ventricolo sinistro associata a dilatazione dell'atrio e del ventricolo ed endocardiosi atrio ventricolare bilaterale. Due animali trattati hanno mostrato una grave pericardite fibrinosa.
In alcuni animali (18/32) sono stati rilevati fenomeni flogistici polmonari anche piuttosto gravi.
Interessante reperto osservato è stato la discreta riduzione di volume della tiroide, rilevata in tutti gli animali trattati (Fig 1).

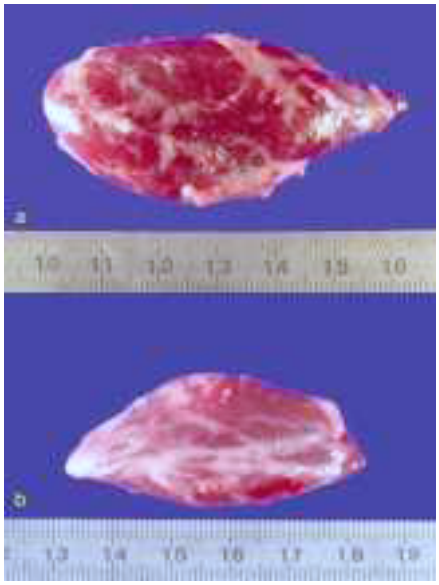


Fig 1. Tiroidi: a) suino alimentato con dieta standard (controllo): tiroide macroscopicamente normale, peso 11.7gr; b) suino trattato con una dieta standard integrata con 10 mg/kg/die di ractopamina: tiroide ridotta di volume, peso 7.14gr.
Fig 1. *Thyroid glands: a) pig provided with standard diet (negative control): normal thyroid, weight 11.7gr; b) pig treated with dietary ractopamine (10 mg/kg/die): hypoplasia of the thyroid gland, weight 7.14gr.*

Relativamente alle indagini istologiche sono attualmente disponibili solo dati preliminari. Tra i reperti ritenuti significativi n° 5/7 campioni di prostata hanno mostrato quadri di iperplasia e lieve metaplasia degli epiteli dell'uretra e in minor misura della ghiandola prostatica stessa (Fig 2).
N° 9/11 ghiandole mammarie presentavano cellule ghiandolari con ipertrofia di grado variabile. Le tiroidi esaminate non hanno rivelato alcuna alterazione microscopica

apparente. La maggior parte dei campioni di fegato (75%) è risultata caratterizzata da glicogenosi multifocale moderata o diffusa.

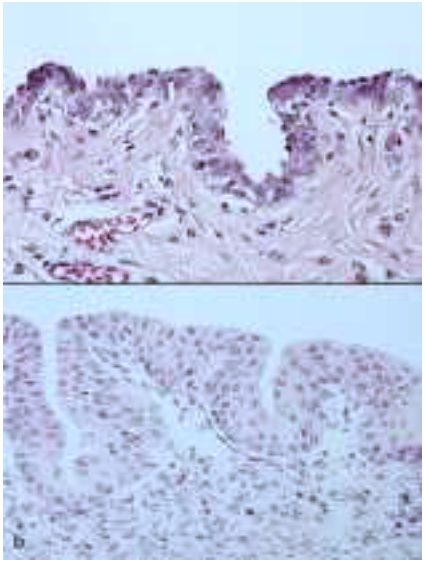


Fig 2. Uretra: a) suino alimentato con dieta standard (controllo): epitelio di transizione; b) suino trattato con una dieta standard integrata con 20 mg/kg/die di ractopamina: iperplasia e lieve metaplasia dell'epitelio.
Fig 2. *Urethra: a) pig provided with standard diet (negative control): transitional epithelium; b) pig treated with dietary ractopamine (20 mg/kg/die): hyperplasia and moderate methaplasia of the epithelium.*

Discussione

Il consumo di carni suine ha attualmente superato il consumo di carne bovina, senza considerare i prodotti lavorati (Rapporto CONAV gennaio 2007- Ministero Politiche Agricole e Forestali DL 173/98 e mod.) e pertanto i controlli sulle carni suinicole sono indispensabili per evitare eventuali ricadute sulla salute del consumatore.
La ractopamina (RAC) è un beta agonista derivato della fenetanolamina analogamente al clembuterolo che agisce stimolando la lipolisi con meccanismi non ancora del tutto chiari. A livello muscolare aumenta la sintesi proteica inducendo ipertrofia e iperplasia in particolare delle miofibre tipo II (Smith, S. B., 1987).
Dosi elevate di trattamento necessarie per ottenere l'effetto di ripartizione comportano alterazioni della funzione cardiaca (aumento di frequenza) e della microcircolazione vasale soprattutto nel suino per prolungata vasocostrizione (Mozzanti G. et al, 2007). L'incremento della frequenza cardiaca è spesso associato anche ad aumento della massa muscolare relativa (Sillence et al., 1993). L'azione broncodilatatrice nei bovini giustificherebbe la scomparsa della cresta tracheale rilevata in questa specie. Nei bovini trattamenti illeciti con clembuterolo, il β-agonista più utilizzato fraudolentemente in questa specie, favorirebbe lo sviluppo di lesioni che assomigliano a quelle degli steroi-

di con idrometra, mucometra e quadri di atrofia ovarica, la cui patogenesi non è ancora chiara (Biolatti et al., 1994; Re et al., 1995).
Nel suino la RAC è noto essere utilizzata illecitamente a dosaggi variabili da 8 a 20 mg/kg di mangime (Apple et al., 2004; See et al., 2004; Carr et al., 2005). A questi dosaggi non compaiono effetti tossici (Williams, 1987).
Marchant-Forde et al. (2003), hanno condotto degli studi in vivo in questa specie rilevando alterazioni comportamentali e fisiologiche. In particolare durante le 4 settimane di trattamento l'animale diventa progressivamente più pigro e meno attivo. Verso fine trattamento la frequenza cardiaca aumenta molto soprattutto se l'animale è sottoposto a fattori stressanti e il dosaggio delle catecolamine circolanti aumenta rispetto ai controlli. Il meccanismo di queste alterazioni non è ancora stato chiarito, ma presumibilmente l'azione della RAC nell'organismo induce una down regulation dei recettori β-AR corporei inducendo il sistema simpatico a incrementare la produzione di catecolamine per ottimizzare il legame con i pochi recettori disponibili (Marchant-Forde et al., 2003).
Nel suino non sono riportati reperti macroscopici associati al trattamento a parte una diminuzione di peso relativo delle tiroidi. Istologicamente pare non ci siano reperti degni di considerazione. Studi approfonditi dal punto di vista istologico di tutti gli organi non sono disponibili. Analogamente non risultano pubblicate indagini biomolecolari e di proteomica condotte in vivo sul suino trattato con ractopamina. La mancanza di queste informazioni impedisce di identificare dei parametri diagnostici riconducibili ad un avvenuto trattamento e non crea così un deterrente per l'allevatore.
Il presente lavoro seppur preliminare conferma quanto riportato in letteratura. Interessanti risultano essere i reperti istologici osservati nelle prostate e nelle ghiandole mammarie che necessitano di ulteriori indagini di conferma. Solo la conclusione delle indagini istologiche permetterà di trarre una valutazione sulla significatività statistica dei dati preliminari riportati. Pare comunque che la ractopamina abbia un comportamento analogo agli ormoni steroidi, come riportato nel bovino.
Questo studio dovrà comunque essere confortato da indagini più approfondite. Indubbiamente esami ultrastrutturali in particolare sui muscoli e sul cuore potranno fornire nuovi dati sulle alterazioni intracellulari indotte dal trattamento. Gli autori desiderano inoltre completare la ricerca servendosi dell'analisi proteomica al fine di individuare eventuali proteine differentemente espresse dai controlli e dai soggetti trattati. Studi biomolecolari potrebbero poi essere effettuati in particolare sul tessuto adiposo. I β-agonisti infatti modificano il metabolismo inducendo un *up-regulation* o una *down-regulation* dei geni coinvolti nei processi di differenziazione cellulare e degradazione delle riserve lipidiche (Mersmann H.J. et al, 1998). Sarebbe pertanto interessante valutare mediante PCR quantitativa l'espressione genica di tali geni e sulla base dei risultati delle indagini molecolari effettuare delle indagini immunoistochimiche.
Suddetta ricerca è esclusivamente uno studio preliminare volto a fornire indicazioni generali tali da poter essere utilizzate in uno studio più ampio che sarà svolto secondariamente su un numero più elevato di animali che saranno trattati con un solo dosaggio di RAC associato a migliori performances dell'animale, in assenza di effetti collaterali. Indagini istologiche, ultrastrutturali, biomolecolari e di proteomica permetteranno di concentrare l'attenzione su alcuni organi bersaglio in particolare che risultano pertanto

essere gli organi target della RAC nel suino. L'attenzione della sperimentazione più ampia sarà pertanto concentrata su pochi organi e permetterà di ottenere dati statisticamente significativi in merito al fine di poter iniziare un piano di sorveglianza attiva sui suini regolarmente macellati a tutela della salute del consumatore.

Lavoro finanziato dalla Regione Piemonte (Progetto Finalizzato 2006).

BIBLIOGRAFIA

Apple J.K., Maxwell C.V., Brown D.C., Friesen K.G., Musser R.E., Johnson Z.B., Armstrong T.A. (2004) "Effects of dietary lysine and energy density on performance and carcass characteristics of finishing pigs fed ractopamine". J. Anim. Sci. 82: 3277-3287.

Biolatti B., Bollo E., Re G., Appino S., Tartari E., Benatti G., Elliott C.T., McCaughey W.J. (1994) "Pathology and residues in veal calves treated experimentally with clenbuterol". Res Vet Sci. 57(3):365-71.

Carr S.N., Ivers D.J., Anderson D.B., Jones D.J., Mowrey D.H., England M.B., Killefer J., Rincker P.J., McKeith F.K. (2005) "The effects of ractopamine hydrochloride on lean carcass yields and pork quality characteristics". J. Anim. Sci. 83:2886–2893.

Kuiper HA, Noordam MY, van Dooren-Flipsen MMH, Schilt R, Roos AH. (1998) "Illegal use of β-Adrenergic agonists: European Community". J. Anim Sci, 76: 195-207.

Marchant-Forde J.N., Lay D.C., Pajor E.A., Richert B.T., Schinckel A.P. (2003) "The effects of ractopamine on the behaviour and physiology of finishing pigs". J Anim Sci 81:416-422.

Mazzanti G., Di Sotto A., Daniele C., Battinelli L., Brambilla G., Fiori M., Loizzo S. , Loizzo A. (2007) "A pharmacodynamic study on clenbuterol-induced toxicity: β_1- and β_2-adrenoceptors involvement in guinea-pig tachycardia in an *in vitro* model". Food and Chemical Toxicology. 45 (9): 1694-1699.

Mersmann H.J. (1998) "Overview of the effects of β-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action". J Anim. Sci. 76: 160-172.

Re G., Badino P., Novelli A., Girardi C. (1995) "Down-regulation of beta-adrenergic receptors and up-regulation of estrogen and progesterone receptors induced in the reproductive system of female veal calves by dietary clenbuterol". Am J Vet Res. 56(11): 1493-1497.

Schaefer A.L., Jones S.D.M., Tong K.W., de Passille A.M.B., Rushen J., Merrill J.K. (1992)"The effect of feeling the beta-adrenergic agonist ractopamine on the behaviour of market-weight pigs". Can J. Anim. Sci. 72:15-21.

See M.T., Armstrong T.A., Weldon W.C. (2004) "Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs" J. Anim. Sci. 82:2474–2480.

Sillence M. N., R. A. Hunter, G. G. Pegg, L. Brown, M. L. Matthews, T. Magner, M. Sleeman, D. B. Lindsay. (1993) "Growth, nitrogen metabolism, and cardiac responses to clenbuterol and ketoclenbuterol in rats and underfed cattle". J. Anim. Sci. 71:2942-2951.

Smith, S. B. (1987)."Effects of β-adrenergic agonists on cellular metabolism". Proc. Rec. Meat Conf. 40:65-72.

Williams, G.D.(1987c) "A target animal safety and drug tolerance study of ractopamine hydrochloride administered in the diet of swine during the finishing period". Unpublished report on study No. T4VVX8510 from Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

MIGLIORAMENTO DELL'EFFICIENZA TOTALE DELLA SALA PARTO IN UN'AZIENDA GESTITA A BANDE BISETTIMANALI. ESPERIENZE DI CAMPO

FARROWING ROOM EFFICIENCY IMPROVEMENT IN A HERD WITH TWO-WEEK BATCH FARROWING SYSTEM. A FIELD EXPERIENCE

C. MAZZONI*; P. BONILAURI¢, E. BORRI§, F. TONON£, PONZIO M.•
**Veterinario libero professionista (Reggio Emilia), mazzoni.claudio@aliceposta.it*
¢ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione diagnostica di Reggio Emilia, paolo.bonilauri@bs.izs.it
§ Veterinario specializzato in Patologia Suina, libero professionista (Reggio Emilia) elenaborri@virgilio.it; £ Veterinario libero professionista (Treviso), tonon@suivet.it
• Agronomo (Cuneo), ponmat@tiscali.it

Parole chiave: bande bisettimanali, assistenza ai parti, svezzamento a balzi
Key words: two-week batch farrowing, farrowing assistance, bump weaning

Riassunto. Nel presente lavoro riportiamo l'esperienza di un'azienda che ha riscontrato un considerevole miglioramento dell'efficienza totale in sala parto (efficienza totale = efficienza della scrofa + efficienza tecnica) attuando la sincronizzazione con un'annessa sistematica attività di assistenza dei parti. Tra i principali vantaggi derivanti da queste pratiche annoveriamo la possibilità di concentrare il maggior numero dei parti nelle ore diurne, garantendo così la presenza del personale per l'assistenza che come diretta conseguenza determina una riduzione delle perdite alla nascita (della natimortalità in particolare), inoltre è possibile disporre di un maggior numero di scrofe tra cui scegliere per gli interventi di pareggiamento. A ciò si aggiunga l'applicazione di una tecnica di adozione sistematica, quale quella dello "svezzamento a balzi", che consente la gestione ed il recupero dei suinetti soprannumerari, contenendone le perdite durante la lattazione, oltre a permettere la creazione di nidiate più uniformi. L'azienda in oggetto è gestita secondo un sistema di svezzamento a bande bisettimanali: da qui il vantaggio di un lavoro più organizzato che consente di concentrare l'attenzione del personale sulle attività della sala parto nella settimana prevista. Viene inoltre descritta la strategia impiegata per la realizzazione dello svezzamento a balzi in un sistema a bande che, come tali, presenta di base una scarsa flessibilità.

Abstract. This paper reports a field experience on a farm that achieved a considerable farrowing room efficiency improvement using a methodical work of farrowing synchronization and assistance. Assembling the majority of the farrowing during the working time making sure the labour assistance and a consequent losses reduction (still-born especially), and the bigger number of sows available for cross-fostering application, are the main advantages. Besides, making it possible to manage the high

prolificacy, the methodical “bump weaning” application allows to reduce suckling period mortality and to create more homogeneous litters. Two-week batch farrowing system has been adopted on this herd: a better work organisation let the labour to concentrate on the farrowing room activities during the scheduled farrowing week. This work also describes how to apply the “bump-weaning” within a batch farrowing system, wich is poorly flexible.

Introduzione

La bibliografia riporta che, analizzando dati aziendali con 11 suinetti svezzati per parto, si può essere autorizzati a pensare che dietro questi numeri vi sia un’applicazione metodica delle adozioni (Muirhead et al., 1997). Certamente il numero dei nati totali ed in particolare quello dei nati vivi, risultano di grande importanza per agevolare il raggiungimento di questo obiettivo. A questo proposito una corretta ed attenta assistenza dei parti ricopre un ruolo di grande importanza per ridurre al minimo le perdite alla nascita (Dziuk P.J. 1979). Quando però il numero dei nati supera oggettivamente le reali capacità della scrofa di allevarli, ecco che si rende necessario intervenire con diverse tecniche di adozione. Riscontrerà certamente il vostro consenso l’affermazione che i 12 suinetti siano un numero decisamente elevato da lasciare in lattazione per ciascuna scrofa. Probabilmente questo non è vero per tutte le genetiche o comunque non è vero in assoluto, ma quello che voglio sottolineare è la grande difficoltà che in generale qualsiasi scrofa, almeno sui grandi numeri ed a prescindere dalla genetica, ha nel portare allo svezzamento covate così numerose. Inoltre la gestione dei sottopeso, gli schiacciamenti, la mortalità delle scrofe, le problematiche sanitarie che interessano la ghiandola mammaria oltre che la covata, sono solo alcuni dei fattori limitanti in grado di condizionare notevolmente il raggiungimento di prestigiosi risultati quali gli 11-12 svezzati di media per scrofa per parto. Con questo non vogliamo dire che non esistano scrofe capaci di svezzare anche 13 o 14 suinetti, ma che il raggiungimento di questi risultati, come valore medio assoluto per scrofa per parto, è davvero molto complicato. Ecco che allora il poter pareggiare le covate a 11, per le pluripare, e 12 per le primipare, potrebbe permettere di aumentare le probabilità di sopravvivenza di quei 1 o 2 suinetti nati vivi in più per covata che, se lasciati assieme ai loro fratelli (13 nati vivi), verrebbero certamente limitate. La scelta di tenere le primipare a 12 suinetti ha sostanzialmente due motivi d’essere, il primo è quello di sfruttare una buona produzione di latte, con spesso un’eccellente disposizione dei capezzoli; il secondo è che una mammella adeguatamente munta al primo parto, risulta più preparata alle lattazioni successive. Vale la pena evidenziare che questa strategia porta ad un notevole deperimento dell’animale alla fine della lattazione, con ripercussioni assolutamente negative per il successivo estro. Tuttavia un’opportuna alimentazione durante la lattazione o particolari strategie zootecniche (split weaning) possono essere di grande aiuto nel risolvere o quantomeno tamponare il problema (Tarocco et all 2000).
Cosa fare quindi con i suinetti eccedenti? L’applicazione di un sistema di adozioni sistematico (Bertacchini et al 2001; Mazzoni 2007) può essere di grande aiuto nella

gestione di queste situazioni. In particolare lo "svezzamento a balzi" (bump weaning) conferma la sua affidabilità nel tempo (Mazzoni et al 2007).

Materiali

L'azienda è collocata nella pianura Reggiana e fa parte di una filiera che prevede un sito 2 ed un sito 3 notevolmente distanti fra loro ed ubicati in province diverse da quella della scrofaia. Fino all'agosto del 2006 presentava una consistenza numerica di circa 650 scrofe. Viene allevata una genetica ibrida inglese e si effettua un'autorimonta interna che passa, comunque, dall'acquisto, in unico conferimento annuale, di scrofette Gran Parentali di 6kg.
La rimonta interna segue un percorso preciso con una prima fase di accrescimento in gruppi variabili fra i 5 ed i 20 soggetti su plastica. Attorno ai 25-30 kg, le scrofette vengono trasferite nell'accrescimento, sempre su plastica, fino al raggiungimento dei 50-60kg. Da qui vengono trasferite in reparti attigui su grigliato in cemento fino al raggiungimento dell'età di copertura (8-8,5 mesi, 140kg). A questo punto vengono portate nel reparto di fecondazione dove incominceranno ad essere stimolate con il verro fino alla fecondazione, che avviene nei box, con successivo trasferimento in gabbia entro 2 giorni dall'ultima inseminazione. Tutti i settori menzionati lavorano in un rigoroso vuoto sanitario di almeno 10 giorni.
Le scrofe dimorano in gabbia gestazione fino a circa 35-40 giorni dalla fecondazione per poi essere trasferite in box multipli costituiti in base alla taglia ed all'ordine di parto. Per quanto riguarda le scrofette, dopo una prima fase di gabbia in gestazione, come per le pluripare, vengono raggruppate in box costituiti da sole scrofette. Dal gennaio del 2006 le pluripare sono alimentate semi ad libitum nella prima fase della gestazione (quella in gabbia) ove per alcuni soggetti si raggiungono anche i 2,5kg/pasto, poi allo spostamento nei box ricevono una razione di circa 2,5 kg capo giorno, in un'unica somministrazione mattutina che, a partire dall'90° giorno sino all'ingresso in sala parto raggiunge progressivamente circa i 3,0-3,4 kg/capo/giorno. La presentazione del mangime è in pellet, poi bagnato, durante la gestazione in gabbia e liquido nei box. All'ingresso in sala parto continuano ad essere alimentate con mangime gestazione nelle stesse quantità previste in gestazione con la differenza che la razione è suddivisa in due pasti. Il giorno prima del parto, mangiano solo alla mattina e il giorno del parto ricevono una modesta razione alla sera, solo quelle scrofe che manifestano appetito. Dal giorno successivo al parto si incomincia con il mangime lattazione, la razione viene progressivamente incrementata nei due pasti fino al 7°-10° giorno circa di lattazione dove le scrofe raggiungono quasi il massimo dell'ingestione. Per essere ulteriormente incrementata, da questo momento fino a fine lattazione viene somministrato un terzo pasto a fine mattinata, almeno per quelle scrofe che hanno lucidato la mangiatoia. In questo modo si sono raggiunti i 6-6,5 kg di ingestione media giornaliera nei 21 giorni di lattazione. La presentazione del mangime è in pellet, poi bagnato, per tutto il periodo. Allo svezzamento le scrofe continuano a mangiare il lattazione fino alla venuta in estro per poi passare, dopo la successiva fecondazione, al mangime gestazione raziona-

to in ragione di 1,8-2,0 kg per i 2-3 giorni successivi. Da qui si passa al semi ad libitum, visto precedentemente, in funzione della condizione corporale dell'animale.
In estate è previsto un sistema di raffrescamento tipo cooling sia per la gestazione che per la sala parto, tuttavia l'ingestione dell'alimento in lattazione viene influenzata negativamente.
I mangimi gestazione e lattazione hanno una formulazione convenzionale eccezion fatta per la lattazione ove abbiamo aumentato i valori a cartellino di lisina a 1,1.
I suinetti svezzati, con ritmo settimanale, venivano tenuti per circa tre-quattro settimane per poi essere inviati in un sito 2, da dove, raggiunti i circa 30-40 kg, venivano trasferiti nel sito 3 dell'ingrasso ove raggiungevano il peso della macellazione.
A partire dal maggio del 2006 è stato introdotto un programma di sincronizzazione ed assistenza dei parti a cui dall'agosto, dello stesso anno, ha fatto seguito l'inevitabile applicazione di un'adozione sistematica, lo svezzamento a balzi, per gestire l'iperprolificità (Mazzoni et al 2007). Negli anni precedenti la sincronizzazione, l'assistenza e le adozioni sistematiche, non erano state prese in considerazione. Veniva applicato un ordinario, ma corretto cross-fostering qualora la simultanea, ma casuale presenza di diversi parti lo permettesse. Il personale preposto alla sala parto, costituito da un tecnico e da un operaio, è rimasto invariato nel corso degli ultimi 4 anni.
Mi preme sottolineare che il primo quadrimestre del 2006 è stato contraddistinto dalla presenza di un gravissimo focolaio di PRRS con ceppo che al sequenziamento si è rivelato eterologo, rispetto a quello abitualmente circolante in allevamento, in grado di determinare oltre 100 aborti e circa 20 scrofe decedute in poche settimane. Fino alla fine di aprile si sono continuati ad avere un consistente numero di natimorti ed un incremento dei mummificati, cosa che, chiaramente, ha scoraggiato un'applicazione sistematica della sincronizzazione dei parti.
Il periodo negativo, sopra menzionato, è comunque servito sia ad ottimizzare il branco dei riproduttori e sia per la preparazione dello staff tecnico all'ulteriore rivoluzione che da lì a poco si sarebbe verificata, il passaggio in bande bisettimanali. L'applicazione di questo nuovo sistema zootecnico, iniziato partendo dalla gestazione nell'agosto del 2006, si è reso necessario per dimensionare correttamente il flusso dei suinetti in uscita dalla scrofaia in rapporto allo spazio disponibile del sito 2 e 3. Inoltre si è deciso di spostare i suinetti verso il sito 2 a 6 kg, quindi allo svezzamento.

Metodi

Sincronizzazione ed assistenza dei parti
Lo scopo principale della sincronizzazione dei parti è quello di permettere un'assistenza, da parte del personale tecnico della sala parto, quanto più accurata possibile, del maggior numero di parti nell'orario di lavoro che, in altro modo rischierebbero di disperdersi nell'arco delle 24-48 ore dalla data prevista. In questo modo è possibile ridurre al minimo l'incidenza dei natimorti oltre che facilitare le operazioni di trasferimento (cross-fostering). Infatti più scrofe fra cui scegliere per i trasferimenti riducono l'incidenza d'errore nella scelta, così come il trasferimento di suinetti fra scrofe che

hanno appena partorito garantisce un successo maggiore nella accettazione dei suinetti trasferiti, per non parlare del colostro che questi soggetti continuerebbero ad assumere anche dopo lo spostamento. Attraverso la sincronizzazione è inoltre possibile ridurre il numero dei parti notturni, vero flagello per chi lavora in sala parto.

Ad ogni modo la sincronizzazione per essere efficace deve sempre prevedere l'assistenza! Una volta accettato questo concetto bisogna conoscere la durata media della gestazione nell'azienda che, nel nostro caso era di 114 giorni. La tecnica di sincronizzazione scelta è stata quella della doppia prostaglandina (Kirkwood et all. 1998) in grado di forzare meno i parti concedendo, per quanto possibile, maggiore flessibilità al sistema. La doppia prostaglandina (cloprostenolo) viene somministrata il giorno antecedente il parto previsto (113° giorno) per via perianale (ad ore 4 od ore 8 rispetto l'ano) in ragione di circa 90 mg per inoculazione (Kirkwood et all. 1996), a distanza di 6 ore una dall'altra (ore 8:00 ed ore 14:00)

Il 114° giorno, quello del parto previsto, viene effettuata una somministrazione mattutina, sempre per via perianale, di 10 UI di ossitocina, pratica forse inutile ma che infonde maggiori sicurezze nel tecnico della sala parto. Ad ogni modo circa l'80% delle scrofe sincronizzate risponde al trattamento di induzione fra le ore 8:30 e le ore 16:00. Importante è sottolineare che le scrofette vengono eluse dal programma di sincronizzazione e lasciate partorire in naturale.

Per quanto riguarda l'assistenza ai parti, abbiamo inserito un metodo di lavoro che prevede l'impiego di una scheda (tab. 1) su cui devono essere registrati gli eventi in modo tale che sia l'operatore, che gli eventuali assistenti o sostituti, possano capire cosa è necessario fare durante il decorso del parto. Una volta collocata sul muro dietro alla scrofa, questa semplice tabella permette di dare un ritmo di lavoro scandito dalla frequenza di espulsione dei suinetti ed è in grado di dettare i tempi delle eventuali esplorazioni vaginali laddove siano necessarie. Dalle indicazioni bibliografiche e dall'esperienza personale, abbiamo ricavato alcuni dati fondamentali al riguardo. Dal primo al terzo suinetto possono trascorrere mediamente dai 30 ai 45 minuti fra un'espulsione e l'altra. Dal terzo quarto fino al decimo circa, dobbiamo attenderci un intervallo decisamente più breve (12- 15 minuti), qui siamo nel cuore del parto. Oltre l'11° suinetto non dovrebbero passare più di dieci minuti. È proprio in quest'ultimo periodo in cui si concentra il maggior numero di natimorti (Randall 1972).

Tab. 1. Prototipo di scheda per l'assistenza ai parti (da Mazzoni 2007 modificato)
Tab. 1. *Example of a form used during farrowing assistance (from Mazzoni 2007 modified)*

Scheda sala parto				
Data:			n° scrofa:	
Ora	Esplorazioni	NV	NM	MM

A questo punto girando metodicamente dietro alle scrofe e registrando gli orari relativi al succedersi delle nascite, è possibile capire quando, dilatandosi troppo i tempi fra un'espulsione e l'altra rispetto ai tempi precedentemente indicati, è necessario intervenire con un'esplorazione.

Adozioni

Il sensibile incremento dei nati vivi (vedi tab. 3) nel corso del 2007, ha spinto lo staff tecnico a prendere in considerazione lo svezzamento a balzi. Questa tecnica, ormai da tempo consolidata nella gestione dei soprannumerari (Thorup et al. 2006), ma anche dei ritardatari (Reese et al., 2006), è una tecnica di adozione sistematica che prevede lo svezzamento di covate in ottimo stato di salute e nutrizione, appartenenti a scrofe di 21 giorni di lattazione, od anche 14-16 giorni (Mazzoni et al 2007; Bertacchini et al 2001). La scrofa lasciata in sala parto, riceverà i suinetti di 7-10 giorni di vita belli anch'essi e provenienti da una scrofa che a sua volta adotterà i neonati da un'altra mamma che ha partorito da 8-48 ore. Sotto quest'ultima scrofa, liberata dalla propria covata, potranno essere così radunati i neonati sottopeso o i soprannumerari (tavola 1).

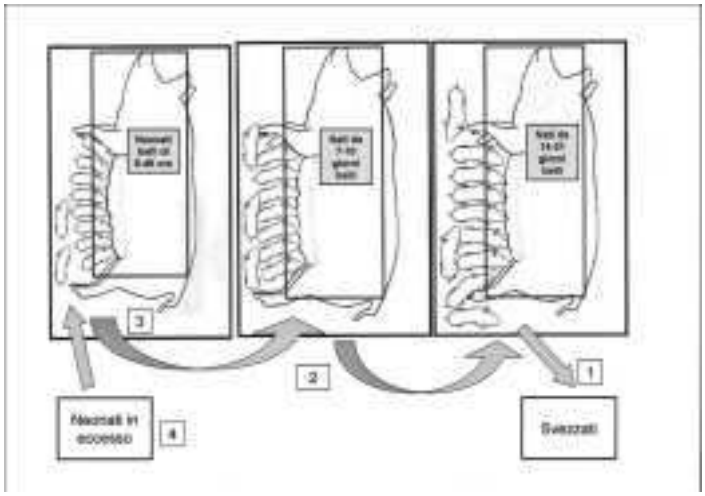


Fig. 1. Schema relativo all'esecuzione dello "svezzamento a balzi" (da Mazzoni 2007 modificato)
Fig. 1. "Bbump-weaning" application diagram (from Mazzoni 2007 modified)

Tale tecnica non deve essere eseguita prima di un adeguato periodo di tempo necessario per una corretta assunzione di colostro, da parte dei neonati, stimato attorno alle 4-12 ore.

Adozioni in regime di banda bisettimanale

A partire dal gennaio del 2007, ovvero da quando sono iniziati i parti delle bande biset-

timanali, la tecnica dello svezzamento a balzi presentava una grossa incongruità nella sua applicazione alla banda. Infatti per le caratteristiche proprie di tale sistema, non sono previste scrofe di 7 giorni di lattazione quando ci si trova nella settimana dei parti. Ricordiamo infatti che nella gestione in banda bisettimanale, l'alternanza di eventi è: svezzamenti in una settimana e la contemporanea presenza di parti e coperture nella settimana successiva.
La problematica è stata affrontata e risolta nel seguente modo: nell'azienda in questione sono presenti due sezioni di sala parto contenenti 4 sale parto con 14 gabbie ciascuna per un totale di 56 gabbie per banda disponibili. Sin dall'inizio dei lavori abbiamo ritenuto opportuno tenere libere circa 3-5 gabbie parto per banda, definite tampone, questo per meglio gestire messe in parto più alte del previsto. Con il passare del tempo sono venute buone sia per la gestione dei suinetti in ritardo di crescita allo svezzamento, per i quali era possibile garantire una extralattazione di 7-14 giorni sotto scrofe svezzate, ma da riforma, e sia per la gestione dei suinetti di 14 giorni derivanti dallo svezzamento a balzi. In buona sostanza rimanevano circa 50-52 parti ogni 2 settimane. Per poter applicare il sistema dello svezzamento a balzi, anche in questo sistema zootecnico, siamo stati costretti a modificarlo leggermente inserendo un 10-12% di parti nella settimana degli svezzamenti. Quindi un vero e proprio "fuoribanda" in grado di garantire il parto di circa 3-6 scrofe 7 giorni prima del grosso della banda. Attenzione però questo fuoribanda deve essere assolutamente conteggiato all'interno dei 50-52 parti, quindi non deve essere un extra. Pertanto la banda dell'azienda deve essere costituita da 3-6 parti più 48-45 parti nell'arco delle due settimane.
A questo punto con l'aiuto della tabella 1 e seguendo la fascia in giallo, vi risulterà facile verificare come al momento del parto della banda vera e propria sia possibile realizzare la tecnica dello svezzamento a balzi. Nell'esempio in questione, i suinetti soprannumerari nati dai parti delle 48 scrofe della banda 2, potranno essere messi sotto una parte delle 5 scrofe, facenti parte sempre della stessa banda, ma con 7 giorni di lattazione alle spalle. I loro suinetti di 7 giorni di vita potranno essere collocati o sotto le scrofe del fuoribanda della banda precedente che, con 21 giorni di lattazione, potranno svezzare le loro covate senza problemi, oppure sotto una qualche scrofa delle 46 della banda precedente che, anche se di 14 giorni di vita, potranno svezzare integralmente alcune covate purché belle ed in piena forma. Questi ultimi soggetti dovranno essere trattati con particolari attenzioni, ma dal loro trasferimento, può dipendere la vita di suinetti soprannumerari neonati. Si parla comunque di 2-3 covate al massimo.
Le scrofe di 14-21 giorni di lattazione usate come balie, dovranno essere trasferite nelle gabbie parto tampone della banda 2 per consentire un adeguato periodo di lattazione ai suinetti ricevuti. Lo spostamento potrà essere effettuato con tutta calma nella settimana successiva che, essendo preposta agli svezzamenti risulta meno carica di lavoro.

Tab. 2. Schema rappresentativo dei flussi delle bande al susseguirsi delle settimane. Il parto (P) è rappresentato in rosso e le varie bande vi si alternano progressivamente da destra a sinistra. Il numero in nero preceduto dal + indica le gabbie parto tampone disponibili per quella banda.
Tab. 2. This diagram shows how the batch farrowing system evolves, week by week. Farrowing event (P) is in red and each batch arrives to it progressively. In black (with a +) is the number of free and available farrow crates for each batch exceeding the real lactating sows number.

		0	7	14	21	28				
BD	6	P	6	6	6	+4				
1	46	46	P	46	46	46				
BD	5	5	5	P	5	5	5	+3		
2	48	48	48	48	P	48	48	48		
BD	8	8	8	8	8	P	8	8	8	+3
3	45	45	45	45	45	45	P	45	45	45

Risultati

Per valutare l'efficacia delle modifiche zootecniche apportare, abbiamo messo a confronto due annate, dal 01.12.2004 fino al 30.11.2005 contro 01.12.2006 fino al 30.11.2007 (Tab. 3).
I dati sono stati raccolti dal programma di gestione aziendale HPA che viene scrupolosamente aggiornato ogni venerdì dal tecnico aziendale.

Tab. 3. Confronto dei dati produttivi nei periodi dal 01.12.2004 fino al 30.11.2005 e dal 01.12.2006 fino al 30.11.2007.
Tab. 3. Comparison between production data reported from 01.12.2004 until 30.11.2005 and from 01.12.2006 until 30.11.2007.

	01.12.2004 fino al 30.11.2005	01.12.2006 fino al 30.11.2007	Differenze
Presenza media (scrofe)	648	554	-94
Numero dei parti	1423	1335	-88
Nati totali	17877	17987	+110
Nati totali per parto	12,56	13,47	+0,91
Nati vivi	15938	16608	+670
Nati vivi per parto	11,20	12,44	+1,24
Nati morti	1688	1049	+639
Mummificati	251	330	+80
Morti in sala parto	1115	1411	+296
Numero totale degli svezzati	12996	14166	+1170
Numero parti/scrofa/anno	2,20	2,40	+0,20
Numero svezzati/scrofa/parto	9,56	10,89 (di cui 1,14 da eff. tecnica)	+1,33
Numero svezzati/scrofa/anno	20,99	26,20	+5,21

Ad una prima analisi, il numero dei parti rispetto alle scrofe presenti; il numero di nati

totali rispetto ai parti; il numero dei nati vivi rispetto ai nati totali non sono significativamente differenti fra i due anni ($p>0,01$). Viceversa la prima cosa che colpisce è che il numero totale degli svezzati rispetto alle scrofe risulta differente ($p<0,01$) fra i due anni con un netto miglioramento a vantaggio del 2007, nonostante il minor numero di scrofe. Anche il numero dei nati vivi rispetto ai parti è differente ($p<0,01$) nel 2007 dove sono nati più suinetti così come i nati morti rispetto ai nati totali sono differenti ($p<0,01$) dal momento che nel 2005 ve ne è stato un numero maggiore.
L'aspetto più negativo riguarda la mortalità durante la lattazione, infatti i morti in sala parto rispetto ai nati vivi si sono rivelati differenti fra i due anni con un significativo aumento nel 2007 ($p<0,01$), ma questo può avere una sua spiegazione che analizzeremo meglio nella discussione.
Tuttavia i dati conclusivi sono assolutamente confortanti e mettono in evidenza che il numero totale degli svezzati rispetto ai nati vivi risulta significativamente differente ($p<0,01$) nel 2007, così come il numero totale degli svezzati è risultato significativamente maggiore nel 2007 se confrontato col totale dei nati ($p<0,01$).

Capitolo statistica
Le differenze nelle frequenze dei nati vivi rispetto ai nati totali, dei nati morti sui nati totali, dei morti in sala parto sui nati vivi, del numero di parti rispetto alla presenza media di scrofe, dei nati totali rispetto ai parti, dei nati vivi rispetto ai parti, del numero totale degli svezzati rispetto ai nati vivi e del numero totale degli svezzati rispetto alla presenza media di scrofe sono state tutte confrontate attraverso il test c^2 e, dato l'elevata numerosità assoluta delle frequenze a confronto il livello di significatività è stato posto cautelativamente uguale a $p<0,01$.

Discussione

Nell'ambito della valutazione dei dati produttivi spiccano due aspetti sostanziali per i quali ogni ulteriore approfondimento potrebbe risultare anche superfluo, visto il taglio prettamente pratico della presente comunicazione. In effetti nel 2007 sono stati svezzati 1170 suinetti in più rispetto al 2005, con 94 scrofe mediamente presenti in meno.
Più nel dettaglio è possibile osservare che i nati vivi (NV) rispetto ai nati totali (NT) dei due periodi analizzati sono confrontabili fra loro, anche se con 88 parti in meno, ma la vera sorprendente differenza è sui natimorti (NM). Nell'arco del 2007 sono nati 110 suinetti in più, ma ne sono morti 639 in meno. Questo può essere imputato a diversi fattori quali il miglioramento della distribuzione degli ordini di parto e dello stato generale di salute della mandria, ma come non dare un peso significativo alla sincronizzazione ed alla successiva attenta assistenza dei parti? Certamente tutte queste attenzioni in più hanno permesso di avere un maggior numero di NV sui quali possiamo quasi considerare normale l'incremento delle perdite durante la lattazione registrato nel 2007 rispetto al 2005, ma nonostante tutto, l'impiego successivo e sistematico dello svezzamento a balzi, anche in presenza di una gestione in banda bisettimanale, ha permesso di svezzare un numero maggiore di suinetti rispetto ai NV (14166 contro

12996) nel 2007. Il dato conclusivo, che vede il numero totale degli svezzati rapportato ai NT nel 2007 surclassare lo stesso dato relativo al 2005, non è che una logica conseguenza del lavoro complessivo svolto in sala parto. Mi preme sottolineare che dei 10,89 suinetti svezzati/scrofa/parto ben 1,14 derivano dallo svezzamento a balzi, ovvero dal lavoro del tecnico della sala parto, efficienza tecnica (Mazzoni 2006), che con metodo ed abnegazione cerca di salvare il maggior numero di suinetti.
Non possiamo chiaramente trascurare il ruolo della gestazione. In particolare del "fattore di moltiplicazione", cioè il numero di parti/scrofa/anno che da un 2.20 del 2005 è passato 2.40 nel 2007. Inoltre le migliorie apportate alla gestione del reparto hanno certamente contribuito ad incrementare il numero dei nati totali nel 2007 rispetto al 2005.
Sommando i vantaggi apportati in sala parto a quelli della gestazione, è stato possibile ottenere i 26,2 suinetti svezzati/scrofa/anno che rispetto al 2005 (20,99) rappresentano certamente un grosso passo in avanti soprattutto in un ottica di riduzione dei costi di produzione, così importante nell'attuale situazione di mercato.

Conclusioni

La gestione in banda bisettimanale, ha permesso all'azienda di sfruttare tutti quei vantaggi zootecnico-sanitari tipici di questo sistema. È stato ridotto il personale di 1,5 unità, sono stati ottimizzati i tempi di lavoro ed è stato possibile operare un rigorosissimo vuoto sanitario, soprattutto nei box della gestazione e nei reparti di accrescimento delle scrofette, con notevoli benefici sanitari sia in scrofaia che nei siti 2 e 3. Tuttavia il sistema è per sua stessa natura, poco flessibile e permette con difficoltà l'applicazione dei convenzionali sistemi di adozione. L'escamotage trovato, ci ha consentito di unire agli effetti benefici, apportati dalla gestione in bande, i favorevoli risultati che derivano dallo svezzamento a balzi esaltato da un'attenta e scrupolosa sincronizzazione ed assistenza dei parti. I miglioramenti sono stati così eclatanti che nel 2007, a fronte di un minor numero di scrofe (-94), sono stati svezzati 1170 suinetti in più rispetto al 2005.

Bibliografia

Bertacchini F., Campani I. (2001) "Manuale di allevamento suino", Bologna, Edagricole

Dziuk P.J. (1979). "Control and machanics of parturition in the pig", An. Repr. Sci. 2,335-342.

Kirkwood R.N., Aherne F.X. (1998). „Increasing the predictability of cloprostenol-induced farrowing in saws", Swine Health and Production, 6(2), 57-59

Kirkwood R.N., Thacker P.A., Aherne F.X., Goonewardene L.A. (1996). "The effect of dose and route of administration of prostaglandin F2a on the parturiente response of sows", Swine Health and Production, 4(3), 123-126

Mazzoni C. (2006) "Efficienza della scrofa ed efficienza tecnica", Prof. Sui., 4, 63-64

Mazzoni C. (2007) "La gestione della sala parto", Milano, Point Vètèrinaire Italie

Mazzoni C., Bonilauri P., Borri E., Gradellini S., Tonon F.(2007) "Gestione dell'iperprolificità

in sala parto mediante l'applicazione del sistema dello "svezzamento a balzi", esperienze di campo", Atti del XXXIII meeting annuale S.I.P.A.S., Modena, 29-30/03/2007, 149-158.
Muirhead M.R., Alexander T.J.L. (1997) "Managing Pig Health and the Treatment of Disease". 5 M Enterprises Ltd, UK.
Randall G.C.B. (1972). "Factors influencing stillbirth and prenatal mortality", Vet. Rec. 90, 183-186.
Reese D.E., Straw B.E. (2006) "The case against evening-up litters until weaning", Nebraska Swine Report 2006, 7-10
Tarocco C., De Rensis F., Kirkwood R.N., Rong-Cai Yang (2000). "Effect of split-weaning interval on return to estrus and sow fertility", Swine Health Prod. 2000;8(5): 221-223
Thorup F., Sørensen A.K. (2006) "Use of one step or two step nurse sows for surplus piglets", 19th IPVS Congress, Copenhagen 16-19 lug., 105

EPISODIO DI PATOLOGIA RIPRODUTTIVA NEL SUINO ASSOCIATO AD INFEZIONE DA *CHLAMYDOPHILA ABORTUS*

CASE REPORT OF REPRODUCTIVE DISORDER ASSOCIATED WITH CHLAMYDOPHILA ABORTUS *IN SWINE*

SPAGGIARI B.[1], GHERPELLI M.[2], MAGNINO S.[3], FALLACARA F.[4], BONILAURI P.[1], DOTTORI M., MERIALDI G.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Reggio Emilia; [2]Medico Veterinario Libero Professionista, Reggio Emilia; [3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Pavia; [4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Biologia Molecolare, Laboratorio Analisi Genomiche, Brescia

Parole chiave: patologia riproduttiva – endometrite – ritorno in estro - *Chlamydophila abortus* – suino
Key words: reproductive pathology – endometritis – repeat breeding - *Chlamydophila abortus* – swine

Riassunto. Gli Autori riportano un caso di patologia riproduttiva in un allevamento suino a ciclo aperto con ridotta percentuale di fertilità associata a scoli vaginali. Le scrofe venivano fecondate con seme di verri aziendali, alcuni dei quali presentavano quadri di orchite. Dopo la riforma delle scrofe con infertilità cronica ed il prelievo dell'apparato genitale femminile in sede di macellazione, sono state effettuate indagini anatomo-patologiche, batteriologiche e biomolecolari sugli uteri. Le stesse indagini sono state applicate ai campioni di seme prelevati da 6 verri aziendali. Sui visceri delle scrofe gli esami di laboratorio hanno evidenziato la presenza di *Chlamydophila abortus*, associata ad altri agenti eziologici di natura batterica. Sui campioni di seme è stato possibile evidenziare *Chlamydophila spp.* L'ulteriore tipizzazione di questo ceppo non è stata possibile per la scarsità del materiale genetico disponibile. Gli animali sono stati sottoposti ad una terapia di massa con clortetraciclina *per os*, che, contestualmente alla decisione di utilizzar seme proveniente da un fornitore esterno, ha consentito un ripristino della fertilità ai valori standard dell'allevamento.

Abstract. *The Authors report a case of reproductive disorder characterized by low fertility associated to vaginal discharges in a swine farrow-to-wean herd. Sows were mated with the semen of farm boars, some of which suffered from orchitis. After culling of sows with chronic reproductive failure and sampling of genital apparatus at slaughter, gross pathology, bacteriology and biomolecular investigations were performed on reproductive organs. Semen samples from 6 farm boars were also tested. Chlamydophila abortus was evidenced from uteri in association with other bacterial agents. Chlamydophila spp. was isolated from boar semen. After an in feed medication with chlortetracycline fertility was restored to herd standard values.*

INTRODUZIONE

I microrganismi appartenenti all'ordine *Chlamydiales*, famiglia *Chlamydiaceae*, sono batteri Gram- negativi intracellulari obbligati, agenti causali di varie patologie negli animali e nell'uomo.
In base alla nuova classificazione tassonomica proposta da Everett et al. (1999), all'interno della famiglia Chlamydiaceae si riconoscono due generi, Chlamydophila e Chlamydia, comprendenti a loro volta nove diverse specie.
Le specie di interesse in patologia suina sono *Chlamydophila (Cp.) abortus*, *Cp. pecorum* e *Chlamydia (C.) suis*, precedentemente classificate come *C. psittaci*, *C. pecorum* e *C. trachomatis*. Queste 3 specie sono state descritte come agenti causali di svariate forme patologiche nel suino, tra cui congiuntivite, polmonite, pericardite, poliartrite, mastite, infezioni intestinali e genitali (Rogers et al. 1993; Storz and Kaltenboeck 1993; Andersen 1994; Szeredi et al. 1996, Schiller et al. 1997, Merialdi et al. 2003).
Nei verri, inoltre, si sono studiate le connessioni tra infezione da clamidie e orchite, epididimite, uretrite ed infiammazione delle ghiandole sessuali accessorie (Sarma et al. 1983).
Nel presente lavoro si riporta un caso di patologia riproduttiva in un allevamento suino a ciclo aperto associato ad infezione genitale da *Chlamydophila abortus.*

MATERIALI E METODI

Allevamento
Il materiale analizzato è pervenuto da un allevamento suino a ciclo aperto, con circa 1100 scrofe produttive ed un tasso di rimonta del 40%. A partire da giugno 2007 si sono verificati frequenti ritorni in estro delle scrofe associati a scoli vaginali, con una riduzione della percentuale di fertilità fino al 50%. Al 2°-3° ritorno in estro le scrofe venivano riformate. Il seme usato per le fecondazioni proveniva dai verri aziendali, alcuni dei quali presentavano quadri di orchite, con scarsa vitalità degli spermatozoi. Nel periodo considerato l'allevamento è risultato sierologicamente positivo a PRRS, ma il virus non è mai stato evidenziato negli accertamenti effettuati in corso di episodi riproduttivi. Gli esami sierologici per malattia di Aujeszky hanno dato esito negativo. Gli esami sierologici per Parvovirus suino erano indicativi di acquisita immunocompetenza su tutto l'effettivo dei riproduttori.

Campioni
In sede di macellazione sono stati prelevati gli apparati genitali di 6 scrofe riformate per problematiche riproduttive croniche. I visceri sono stati immediatamente refrigerati e sottoposti ad indagine necroscopica ed agli esami di seguito descritti. In allevamento si è proceduto al prelievo di seme da 6 verri, 2 dei quali manifestavano orchite subacuta. I campioni sono stati suddivisi in 3 pool ed immediatamente congelati.

Metodiche analitiche
Gli uteri ed i campioni di seme sono stati sottoposti ad esame batteriologico mediante semina su Agar globuli addizionato di supplemento C (37°C, 48h, 5% CO_2) e su Gassner agar (37°C, 48h).
Per la ricerca delle clamidie con metodica PCR si è utilizzato un protocollo finalizzato al rilevamento di una porzione del gene ribosomiale 16S (Ossewaarde e Meijer 1999). Per la successiva identificazione di specie si è fatto ricorso al sequenziamento del prodotto di amplificazione mediante tecnica automatica a marcati fluorescenti.

RISULTATI

All'esame anatomo-patologico dei visceri, un campione presentava aspetti di cervicite e metrite purulenta (fig. 1) con presenza di un feto mummificato, un campione cervicite-metrite sierosa con iperemia della mucosa endometriale, due campioni la sola iperemia della mucosa endometriale e due campioni non presentavano lesioni macroscopiche.

Fig. 1. Endometrite purulenta in una delle scrofe riformate.
Fig. 1. *Purulent endometritis in one of culled sows.*

L'esame batteriologico sugli uteri con cervicite-metrite e/o iperemia endometriale ha permesso l'isolamento di vari microrganismi: *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli* e *Streptococcus spp*. L'esame batteriologico dal seme di verro non ha fornito risultati significativi.
All'indagine biomolecolare per l'individuazione delle clamidie mediante PCR, sono risultati positivi gli uteri con metrite e/o iperemia endometriale (Fig.2). In seguito si è proceduto alla sequenziazione genomica dell'DNA estratto, che ha confermato il 100% di omologia della regione sequenziata con *Chlamydophila abortus*. I campioni di seme

sono risultati debolmente positivi alla PCR per *Chlamydophila spp*., quindi non è stato possibile procedere ad un'ulteriore identificazione di specie.

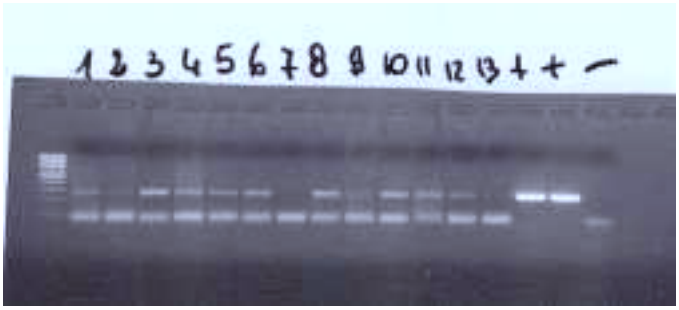


Fig. 2. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR per *Chlamydophila spp.* I campioni dal numero 3 al numero 6 si riferiscono agli uteri con metrite e/o iperemia endometriale.
Fig. 2. *Agarose gel electrophoresis of PCR for detecting* Chlamydophila spp. *(Ossewaarde e Meijer 1999). Samples from line 3 to line 6 referred to sow uterus with metritis and / or hyperemia.*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I disturbi della fertilità ad eziologia incerta sono una delle principali cause di riforma delle scrofe. Numerosi studi hanno riportato il coinvolgimento delle clamidie nella patologia riproduttiva del suino, con sintomi molteplici: aborto, mummificazioni, natimortalità, mortalità neonatale e perinatale, ritorno in estro, secrezioni vaginali (Thoma et al. 1997, Daniels et al. 1994, Wendt et al. 1998).
Le specie maggiormente coinvolte sono *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* e *C. suis*, talora associate in infezioni miste (Schiller et al. 1997).
L'*habitat* naturale delle clamidie è il tratto intestinale (Nietfield et al. 1997), infatti la presenza di *Cp. abortus* e *C. suis* è stata dimostrata nell'intestino di suini clinicamente sani (Szeredi et al 1996, Schiller et al. 1997). La localizzazione intestinale è stata anche interpretata come sito di latenza dell'infezione (Rogers and Andersen 1996, Szeredi et al 1996).
Studi sierologici dimostrano l'elevata prevalenza dell'infezione da clamidie negli allevamenti suinicoli in Europa (Vanrompay et al. 2004, Camenisch et al. 2004).
Spesso agenti virali (e.g. PRRS, Parvovirus suino) o batterici sono associati all'infezioni da clamidie (Thoma et al. 1997, Wendt et al. 1998), suggerendo un'azione sinergica dei vari agenti patogeni.
Nel presente allevamento la riduzione della percentuale di fertilità aveva toccato il 50% (Tabella A). Secondo il parere degli Autori, il ruolo di *Chlamydophila abortus*, evidenziata dagli uteri delle scrofe, e di *Chlamydophila spp.* isolata dal seme dei verri aziendali, potrebbe essere ritenuto primario nell'eziopatogenesi dell'infertilità in allevamento. I batteri isolati all'esame batteriologico degli uteri hanno verosimilmente assunto il ruolo di patogeni secondari/opportunisti, in una condizione di indebolimento della mucosa endometriale, che peraltro costituisce uno degli organi bersaglio delle

clamidie nel suino (Kauffold et al. 2006). La remissione della sintomatologia dopo il trattamento di massa delle scrofe con clortetraciclina (800 ppm nel mangime per 21 gg) e la concomitante decisione di sostituire il seme aziendale con quello di un fornitore esterno tenderebbero a convalidare l'ipotesi di un ruolo primario svolto dalle clamidie evidenziate dai test PCR. (Tabella 1)

Tab. 1. Parametri riproduttivi dell'allevamento, considerati dal momento di massima infertilità al miglioramento in seguito al trattamento con clortetraciclina e sostituzione del seme aziendale.
Tab. 1. *Herd reproductive parameters from the moment of maximum reproductive failure to fertility improvement following chlortetracycline treatment and introduction of semen from an outer source.*

Settimana 2007	27°	28°	29°	30°	31°	32°	33°	34°	35°	36°
						Trattamento con clortetraciclina 800 ppm/Kg M.C.I. per 21gg.				
% Fertilità	50,0	60,3	60,0	69,8	78,3	73,5	76,6	77,8	74,7	81,5
Coperture fecondanti	26	38	33	37	47	50	59	61	60	65

La prevalenza dell'infezione da clamidie nei verri, e di conseguenza la possibilità di trasmissione venerea alle scrofe, sono poco conosciute. Esistono studi a tal riguardo che propongono risultati contrastanti (Kauffold et al. 2006, Teankum et al. 2006). In questo caso clinica, la positività del seme a *Chlamydophila spp.,* associata all'infezione da *Chlamydophila abortus* nelle scrofe, lascia ipotizzare una correlazione tra la patologia riproduttiva delle scrofe e l'infezione nei verri anche se la conferma dell'appartenenza dei ceppi isolati alla stessa specie non è stata possibile per motivi tecnici. Da non trascurare è quindi il potenziale ruolo del verro nel mantenimento dell'infezione in modo sintomatico e/o asintomatico e la possibilità di trasmissione venerea dell'infezione. Sulla scorta dei risultati ottenuti si evidenzia l'opportunità di ulteriori approfondimenti per definire con maggiore chiarezza quale ruolo possano questi patogeni ricoprire nell'ampio campo della patologia riproduttiva del suino e quali meccanismi siano alla base della loro persistenza e diffusione fra i riproduttori.

BIBLIOGRAFIA

Andersen A.A. (1994) "Chlamydial diseases in swine". Proceedings of the 25th annual meeting of the American Association of Swine Pratictioners, Chicago, Illinois, 5th-8th March 1994, 259-263.

Camenisch U, Lu Z.H., Vaughan L., Corboz L. Zimmermann D.R., Wittenbrink M.M., Pospichil A., Sydler T. (2007) "Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pig". Vet. Rec. 155, 593-596.

Daniels E.K., Woollen N.E., Wilson D.J., Phillips L.M., Yeary T. (1994) "Investigating the link between Chlamydia and perinatal morbidity and mortality in swine herds". Vet. Med 89, 157-162.

Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. (1999) "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamidiaceae fam.nov. and Simkaniaceae fam.nov., each containing one

monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organism". Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 415-440.

Hotzel H., Berndt A., Melzer F., Sachse K. (2004) "Occurrence of Chlamydiaceae spp. in a wild boar (Sus scrofa L.) population in Thuringia (Germany)". Vet. Microbiol. 103, 121-126.

Kauffold J., Melzer F., Henning K. Schulze K., Leiding C., Sachse K. (2006) "Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination". Theriogenology 65, 1750-1758.

Merialdi G., Magnino S., Franchi L., Santoni R., Luppi A., Bonilauri P., La balestra I., Vigo P.G., Dottori M. (2003) "Descrizione di un episodio di congiuntivite nel suino associato ad infezione da Chlamydia suis". Atti del XXIX Meeting annuale SIPAS, Salsomaggiore Terme (PR), 27-28 Marzo 2003, 317-321.

Nietfield J.C., Lesile-Steen P., Zeman D.H., Nelson D. (1997) "Prevalence of intestinal chlamydial infection in pigs in the Midwest, as determined by immunoperoxidase staining". Am. J. Vet. Res. 58, 260-264.

Ossewaarde J.M., Meijer A. (1999) "Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales". Microbiology 145, 411-417.

Rogers D.G., Andersen A.A., Hogg A., Nielsen D.L., Huebert M.A. (1993) "Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with chlamydiae in swine". J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 1321-1323.

Rogers D.G., Andersen A.A. (1996) "Intestinal lesions caused by two swine chlamydial isolates in gnotobiotic pigs ". J. Vet. Diagn, Invest. 8, 433-440.

Sarma D.K., Tamuli M.K., Rahman T., Boro B.R., Deka B.C., Rajkonwar C.K. (1983) "Isolation of Chlamydia from a pig with lesions in the uretra and prostate gland". Vet. Rec. 112, 525.

Schiller I., Koesters R., Weilenmann R., Thoma R., Kaltenboeck B., Heitz P., Pospichil A. (1997) "Mixed infections with porcine Chlamydia trachomatis/pecorum and infections with ruminant Chlamydia psittaci serovar 1 associated with abortion in swine". Vet. Microbiol. 58, 251-260.

Storz J., Kaltenboeck B. (1993) "Diversity of Chlamydia-induced diseases" in: Woldehiwet Z., Ristic M. "Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals", Pergamon Press Ltd., Oxford, 363-393.

Szeredi L., Schiller I., Sydler T., Guscetti F., Heinen E., Corboz L., Eggenberger E., Jones G.E., Pospichil A. (1996) "Intestinal Chlamydia in finishing pigs". Vet. Pathol, 33, 369-374.

Teankum K., Pospichil A., Janett F., Bürgi E., Brugnera E., Hoelzle K., Polkinghorne A., Weilenmann R., Zimmermann D.R., Borel N. (2006) "Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts". Vet. Microbiol. 116, 149-157.

Thoma R., Guscetti F., Schiller I., Schmeer N., Corboz L., Pospichil A. (1997) "Chlamydiae in porcine abortion". Vet. Pathol. 34, 467-469.

Vanrompay D., Geens T., Desplanques A., Hoang T.Q., De Vos L., Van Loock M., Huyck E., Mirry C., Cox E. (2004) "Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms". Vet. Microbiol. 99, 59-66.

Wendt M., Eggemann G., Wittenbrink M., Jäger C., Weiß R., Failing K. (1998) "Prevalence of chlamydial infection in breeding sows". Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, UK, 5th-9th July 1998, 379.

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA SALMONELLA ENTERICA IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA: MODELLO DI DISTRIBUZIONE IN FASCE A DIFFERENTE PREVALENZA

SALMONELLA ENTERICA INFECTION SPREADING IN NORTHERN ITALY HERDS: SUBDIVISION MODEL INTO THE GROUPS WITH DIFFERENT PREVALENCE

NIGRELLI A.D., ALBORALI L., BOLDINI M., FABBI M., VEZZOLI F.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Parole chiave: Salmonella, suino, elisa-test.
Key words: Salmonella, pig, elisa-test.

Riassunto. Gli autori hanno evidenziato, mediante due test elisa diversi, un'elevata prevalenza dell'infezione da *Salmonella enterica* in 109 allevamenti suini del Nord Italia, con caratteristiche diverse (dimensioni, pavimentazione, tipologia produttiva), sia nei riproduttori che nei suini da macello.
Hanno evidenziato, inoltre, la possibilità di suddividere gli allevamenti in fasce a differente prevalenza, al fine di poter modulare gli interventi correttivi e di misurare gli eventuali miglioramenti nel tempo. Si propone, anche, un modello per verificare la presenza di sierotipi di *Salmonella* rilevanti per la salute pubblica. Non sono state riscontrate correlazioni significative fra livello di sieropositività e tipologia di produzione (ciclo chiuso, multisito, solo ingrasso), pavimentazione (grigliato o pavimento misto) e dimensione dell'azienda.
Gli studi sierologici longitudinali hanno confermato la importante sieroprevalenza nei riproduttori e nei suini all'ingrasso.

Abstract. The authors found, by two different elisa-tests, an high spreading of Salmonella enterica infection in 109 pig hends of Northern Italy, with different characteristics (size, floor, type of production) either into the sows or into the fattening pigs.
The Authors found, too, the possibility of subdividing herds into groups with different infection level, for measuring progressive reduction of S*almonella enterica* spreceding the Authors didn't found an positive correlations between positive sera percentage and size, and floor or production type of herds tested.
Longitudinal serologic studies confirmed the high seroprevalence in sows and fattening pigs.

Introduzione

Il regolamento dell'Unione Europea CE 2160/2003, derivato dalla Direttiva Zoonosi 2003/99/CE, rende obbligatorio agli Stati Membri la presentazione di programmi di

sorveglianza per i sierotipi di *Salmonella enterica* rilevanti per la sanità pubblica, anche nella popolazione suina.
Tali piani, che in alcuni Paesi UE sono già attivati, spesso gestiti dalle stesse Organizzazioni degli allevatori, devono perseguire obiettivi precisi e misurabili di riduzione della prevalenza, secondo le scadenze previste dall'Unione Europea per le varie specie di animali da reddito e per le diverse categorie.
Gli obiettivi comunitari potrebbero essere definiti entro il 2008 ed entrare in vigore nel 2010 sulla base dei risultati dello studio effettuato nel corso del 2007 in tutti i Paesi della comunità, che ha portato al monitoraggio, per l'infezione da Salmonella enterica (Dec. UE 668/2006), nei suini alla macellazione.
Il presente studio è finalizzato a valutare la prevalenza, su base sierologica e batteriologica, dell'infezione da *Salmonella enterica* in 109 allevamenti del Nord Italia, considerando le dimensioni, la tipologia produttiva (ciclo chiuso, ingrasso) ed il tipo di pavimentazione, al fine di verificare la possibilità di proporre un modello di stratificazione delle aziende in più livelli a differente prevalenza di infezione, sia per quanto riguarda i suini all'ingrasso che i riproduttori, al fine di modulare le azioni correttive e di valutare i risultati in termini di riduzione della prevalenza.
Lo studio è finalizzato, inoltre, a valutare la presenza di sierotipi di *Salmonella enterica* rilevanti per la salute pubblica ed eventuali correlazioni significative tra alcune caratteristiche degli allevamenti (dimensione, tipologia di produzione, pavimentazione) ed il livello di infezione da *Salmonella*.
Infine sono riportati i profili sierologici per *Salmonella* di alcuni allevamenti a ciclo chiuso, al fine di meglio comprendere la circolazione della stessa.
Le conoscenze acquisite potranno essere trasferite al Servizio Sanitario Nazionale, al fine di formare informazioni utili per la messa a punto di un Piano di Sorveglianza e Controllo dell'infezione da *Salmonella enterica* nella popolazione suina.

Materiali e Metodi

Sono stati identificati 109 allevamenti con una produzione minima annua di almeno 4000 suini, stratificati in funzione delle dimensioni, della tipologia di produzione, della pavimentazione.
In 29 allevamenti, con fase di ingrasso, (ciclo chiuso o ingrasso) sono stati prelevati mensilmente per tre volte a lotti di 150 – 300 suini pronti per la macellazione, 30 campioni di sangue che venivano sottoposti al test Elisa *Salmonella* Idexx, con antigene costituito da lipopoli-saccaridi dei sierogruppi B, C e D_1. La prevalenza dell'infezione da Salmonella è stata calcolata sulla media dei risultati dei tre campionamenti; per la lettura del test sono stati utilizzati due cut off OD 20% (soglia di positività S/P = 0,5) e OD 40% (soglia positività S/P = 1), i risultati delle due letture sono poi stati confrontati. Contemporaneamente ai prelievi sierologici in 8 box, è stato effettuato un prelievo di pool di feci per sottoporlo alla ricerca di Salmonella enterica mediante ISO 6579 AMD1, AnnexD, al fine di verificare la frequenza di sierotipi di Salmonella rilevanti per la salute pubblica.

In 28 allevamenti con fase di ingrasso, (ciclo chiuso o ingrasso) ed in 41 allevamenti con fase di riproduzione (ciclo chiuso o aperto) ed infine, in 11 siti 2 (solo fase di svezzamento 28/30 kg), sono stati prelevati una sola volta 20 campioni di sangue rispettivamente da soggetti all'ingrasso pronti alla macellazione, scrofe e soggetti svezzati. I campioni sono stati testati con metodo Elisa ed antigene a base di lipopolisaccaridi di sierogruppi B, C ed E secondo WHO, Zoon, 94, p123.
Infine, in cinque allevamenti a ciclo chiuso, sono stati effettuati studi sierologici longitudinali con lo scopo di verificare la dinamica della circolazione di *Salmonella enterica* nelle varie fasi: nullipare, primipare, pluripare, sottoscrofa, svezzamento, magronaggio ed ingrasso.

Risultati

In base ai risultati ottenuti gli allevamenti testati sierologicamente sono stati suddivisi in fascie a differente prevalenza di sieropositività (Tabelle 1,2,3,4).
I risultati delle ricerche batteriologiche sono riportate nelle Tabelle 6,7.
I risultati dello studio della dinamica dei profili sierologici longitudinali sono riportati in Tabella 5.

Tab. 1. Prevalenza sierologica da *Salmonella enterica* in 28 allevamenti del Nord Italia testati 3 volte in partite di soggetti pronti alla macellazione: confronto di due letture a differenti cut-off utilizzando kit-Idexx.
Tab. 1. Salmonella enterica *sierologic prevalence in 28 hends oh Northern Italy 3 times tested in pig groups at slaughter comparation of the results obtained by two different cut-off with kit Idexx.*

Fasce di prevalenza	N. allevamenti	
	Cut-off OD 20% soglia di positività SP=0,5	Cut-off OD 40% soglia di positività SP=1
Positività sierologica superiore al 70%	18 (64,28%)	4 (14,28%)
Positività sierologica tra 40% e 70%	4 (14,28%)	10 (35,7%)
Positività sierologica tra 10% e 40%	4 (14,28%)	8 (28,5%)
Positività sierologica tra 1% e 10%	2 (7,14%)	5 (17,8%)
Negatività sierologica	-	1 (3,5%)

Tab. 2. Prevalenza sierologica da *Salmonella enterica* in suini a fine ingrasso appartenenti a 28 allevamenti del Nord Italia testati una sola volta con antigene e metodica Elisa preparati secondo WHO, Zoon, 94,123.
Tab. 2. Salmonella enterica *sierologic prevalence at slaughter of swine from 28 herds of Northern Italy, tested on time by antigene elisa method prepared according to WHO, Zoon, 94,123.*

Fasce di prevalenza	N. allevamenti
Positività sierologica superiore al 70%	11 (39,28%)
Positività sierologica tra il 40% e 70%	11 (39,2%)
Positività sierologica tra il 10% e 40%	3 (10,7%)
Positività tra l'1% ed il 10%	2 (7,1%)
Negatività sierologica	1 (3,5%)

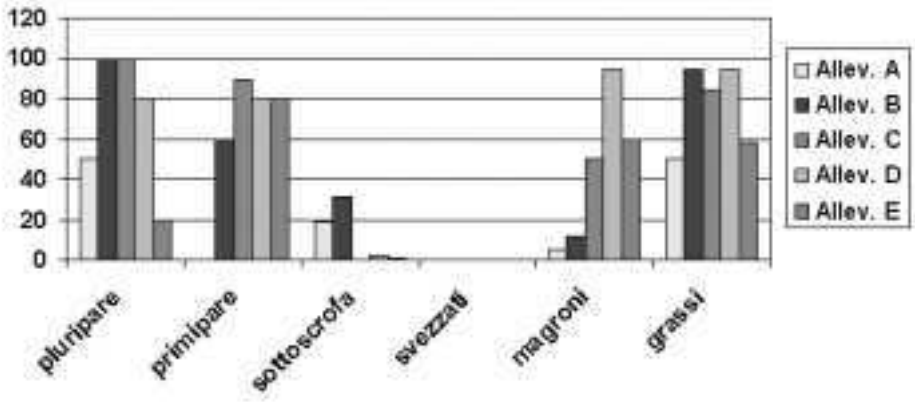
Tab. 3. Prevalenza sierologica da *Salmonella enterica* in scrofe appartenenti a 41 allevamenti del Nord Italia, testati una sola volta con antigene e test Elisa preparati secondo WHO, Zoon, 94, 123.
Tab. 3. Salmonella enterica *sierologic prevalence in sows from 41 herds of Northern Italy, one time tested with antigen and elisa method prepared according WHO, Zoon, 94, 123*

Fasce di prevalenza	Allevamenti
Positività sierologica superiore al 70%	27 (65,8%)
Positività sierologica tra il 40% e 70%	12 (29,26%)
Positività sierologica tra l'1% e 40%	2 (4,8%)
Negatività sierologica	-

Tab. 4. Prevalenza sierologica da *Salmonella enterica* in 11 allevamenti sito 2 (7-30 kg) del Nord Italia, testati 1 sola volta.
Tab. 4. Salmonella enterica *serologic prevalence in 11 - two site herds (7-30 kg) of Northern Italy.*

Fasce di prevalenza	Allevamenti
Positività sierologica > 60%	0
Positività sierologica tra il 20 e 60%	2 (18,18%)
Positività sierologica tra il 5% e 20%	2 (18,18%)
Positività sierologica < 5%	2 (18,18%)
Negatività sierologica	5 (45,45%)

Tab. 5. Profilo sierologico longitudinale per *Salmonella enterica* in cinque allevamenti a ciclo chiuso.
Tab. 5. Salmonella enterica *sierological longitudinal study in 5 sows to fattening herds.*



Tab. 6. Frequenza di sierotipi di *Salmonella enterica* rilevanti per la salute pubblica in prelievi ambientali ripetuti tre volte in box stabulati da suini pronti per la macellazione in 21 allevamenti del Nord Italia.
Tab. 6. Salmonella enterica *serotypes importants for pubblic health in environment samples in box with pigs and slaugther in 21 herds of Northern Italy.*

	S. Tiphymurium	S. Tiphymurium – S. Derby
Allevamenti negativi	12	8
Allevamenti positivi 1 volta	6	8
Allevamenti positivi 2 volte	3	4
Allevamenti positivi 3 volte	0	1

Tab. 7. Prevalenza sierologica di *Salmonella enterica* in lotti di suini pronti alla macellazione di 21 allevamenti del Nord Italia testati 3 volte.
Tab. 7. *Bacteriologicol speading of Salmonella enterica into the 3 time tested pigs groups at slaughter from 21 hends of Northern Italy.*

Allevamenti positivi 1 volta	71,43%
Allevamenti positivi 2 volte	28,57%
Allevamenti positivi 3 volte	0%

Discussione e Conclusione

La prevalenza di infezione, valutata sierologicamente da *Salmonella enterica* risulta essere elevata con entrambi gli antigeni e test utilizzati.
E' confermata la possibilità di suddividere gli allevamenti con fasce a differente prevalenza (Tab. 1,2,3,4); la distribuzione degli allevamenti nelle varie fasce è influenzata dal cut-off di lettura del test (Tab. 1).
La stratificazione degli allevamenti in fasce di prevalenza permetterebbe di modulare gli interventi nei vari allevamenti in funzione del differente livello di infezione e di valutare nel tempo le eventuali riduzioni, vista l'elevata diffusione della sieropositività.
La prevalenza dell'infezione è risultata elevata, anche mediante la valutazione batteriologica, ben oltre la prevalenza riscontrata nello studio effettuato nell'ambito della Dec. UE 668/2006, che si attesta intorno al 17-13%; e ha confermato la possibilità di una distribuzione degli allevamenti in fasce a differente prevalenza di infezione anche con metodo batteriologico (Tabella 7).
E' risultata evidente la presenza di sierotipi di *Salmonella enterica*, rilevanti per la Sanità pubblica con frequenza differente da allevamento ad allevamento (Tabella 6), anche in presenza di uguale livello di siero positività: ciò ci porta a valutare l'opportunità di associare tests sierologici e batteriologici in un eventuale piano di controllo.
Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, tra livello di sieropositività ed alcune caratteristiche d'allevamento: dimensioni, tipologia di produzione (ciclo chiuso, multisede, solo ingrasso) e pavimentazione (pavimento unito o grigliato).
Infine è stata rappresentata la circolazione dell'infezione in cinque allevamenti a ciclo chiuso che evidenzia: una scarsa presenza di anticorpi passivi, una scarsa circolazione dell'infezione nella fase di svezzamento (6 – 30 kg), mentre sulla fase di ingrasso si riscontra un'elevata sieropositività che sta ad indicare un'aumento della prevalenza in funzione dell'età, aspetto che non è certo favorevole alla produzione tipica italiana, rispetto a quelle di altri Paesi che macellano i suini ad età inferiore (Tabella 5).

Bibliografia

Anonymous (2002) "Salmonella: control, multiple antibiotic resistance and ELISA testing". Wwwoldcastlelabs.ie/documents/IV-Salmonella.pdf

Anonymous (2004) "Zoonoses Action Plan Salmonella Programme, Annual Report July 2003 – June 2004" www.bpex.org

Anonymous (2005) “Guideline Salmonella monitoring” www.q-s.info
Anonymous (2006) “Salmonella control update and action plan” www.bpex.org
Barber D.A., Bahnson P.B. , Jsaacson R., Jones C.J., Weigel R.M. (2002) “Distribution of Salmonella in swine production ecosystems” Journal of Food Protection 65, 1861 -1868
Beloeil P.A., Fravalo P., Fablet C., Jolly J.P., Eveno E., Hascoet Y., Chauvin C., Salvat G., Madec F. (2004) “Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds” Preventive Veterinary Medicine 63, 103-120
Berends B., Urlings H., Snijders J., Van Knapen F. (1996) “Identification and quantification of risk factors in animal management and trasport regarding Salmonella spp. in pigs” International Journal of Food Microbiology 30, 37 – 53
Blaha T. (2004) “Lessons learned from implementing a Salmonella moniroring and reduction programme for pork in Germany” Actualites en production porcine (A.F.M.V.P.) 119-123, Maisons – Alfort 1-3 Decembre 2004, France
Boes J., Kristensen C.S., Jorgensen L. (2006) “Effect of benzoic acid in the feed on Salmonella typhimurium in weaned pigs” Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 July 2006, Copenhagen, Denmark
Botteldoorn N., Heyndrickx M., Rijpens N., Grijspeerdt K., Herman N. (2003) “Salmonella on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse” Journal of Applied Microbiology 95, 891-903.
Buxton A., Fraser G. (1977) “Animal Microbiology” Oxford, Blackwell scientific Publications.

CLOSTRIDIUM DIFFICILE NEL SUINO: RILIEVI BATTERIOLOGICI, IMMUNOENZIMATICI E BIOMOLECOLARI A CONFRONTO

EVALUATION OF BACTERIOLOGICAL EXAMINATION, ELISA TOXINS TEST AND REAL-TIME PCR IN THE DIAGNOSIS OF PORCINE CLOSTRISDIUM DIFFICILE *ASSOCIATED DISEASE*

LUCA BANO[1], ILENIA DRIGO[1], FABRIZIO AGNOLETTI[1], MONIA COCCHI[1], TIZIANA FERRO[1], COSETTA BACCHIN[1], ANGELA GUOLO[1], BARBARA MARCON[1], MICHELA BONCI[2], GIUSEPPE MERIALDI[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Treviso;*

[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Reggio Emilia*

Parole chiave: suino, *Clostridium difficile*, tossine, enterite, Real-Time PCR
Keywords: swine, *Clostridium difficile*, toxins, enteritis, Real-Time PCR

Riassunto. Con il presente studio si è voluta indagare la diffusione di *Clostridium difficile* (CD) in campioni fecali, contenuti intestinali e tamponi rettali prelevati da suini con sintomatologia enterica in atto o deceduti in seguito a questa, appartenenti a varie fasi d'accrescimento (sottoscrofa, post-svezzamento, magronaggio, ingrasso). La ricerca di CD è stata eseguita mediante esame colturale con terreno selettivo e mediante Real-Time PCR; i campioni, inoltre, sono stati sottoposti alla ricerca delle tossine A e B tramite ELISA. Gli isolati sono stati identificati e tossinotipizzati mediante multiplex PCR in grado di evidenziare il gene specie-specifico *tpi* e i geni *tcdA* e *tcdB* codificanti rispettivamente le tossine A e B. CD è stato isolato dal 23,3% dei campioni, con una prevalenza maggiore (43,5%) nei soggetti lattanti. Fra i 27 ceppi di CD isolati 13 sono risultati *tcdA+/tcdB+*,1 *tcdA-/tcdB- e 13 tcdA-/tcdB+*.
La Real-Time PCR ha evidenziato una sensibilità superiore rispetto all'esame batteriologico permettendo di individuare la presenza di CD dal 28,2%dei campioni; le concentrazioni di CD più elevate (10^2-10^3 UFC/g) sono state osservate nei campioni risultati positivi sia all'esame batteriologico che alla ricerca delle tossine.
I risultati confermano l'elevata suscettibilità del suino lattante nei confronti di CD ma evidenziano il coinvolgimento di questo microrganismo anche in episodi diarroici di soggetti d'età superiore, quali scrofe e suini all'ingrasso.
Infine la Real-Time PCR abbinata al test immunoenzimatico per la ricerca delle tossine, si è dimostrata uno strumento affidabile e rapido per la diagnosi della clostridiosi da CD.

Abstract. In order to investigate the role of *Clostridium difficile* (CD) in swine enteritis outbreaks, 79 faecal samples, 30 intestinal contents and 12 rectal swabs were collected from subjects with a history of diarrhoea, in 31 different farms. Samples were stratified by growing phase (suckling, post-weaning, growing, fattening). Each sample was cul-

tured in a selective medium for CD. Isolates were identified by a commercial biochemical panel kit and by the specific CD *tpi* gene PCR. Each isolate was tested by multiplex PCR to reveal the presence of *tcd*A and *tcd*B genes encoding for toxin A and toxin B respectively. The samples were screened for CD toxins A and B by using a commercial ELISA. 26 intestinal contents and 73 faecal samples were tested by Real-Time PCR to enumerate CD CFU per g of sample. CD was recovered from 27 samples and the higher prevalence was evidenced in suckling pigs (43.5%). Thirteen strains resulted positive for both *tcd*A and *tcd*B genes, one strain was *tcd*A-/*tcd*B-, whereas 13 resulted *tcd*A-/*tcd*B+. 28 samples tested positive by Real-Time PCR and the higher concentrations of CD (10^2-10^3 UFC per g) was detected in samples resulted positive for both toxins and cultural examinations. Toxin A and B were detected in 21 of the 27 samples positive for CD. This study point out the fact that CD is involved in outbreaks of enteric disease in swine, irrespective of age even if the higher prevalence was detected in suckling pigs. Furthermore the enumeration of this enteric pathogen by Real-Time PCR coupled with ELISA toxin test provides a rapid and accurate tool for the diagnosis of clostridiosis supported by CD.

INTRODUZIONE

Clostridium difficile (CD) è un bacillo gram-positivo, sporigeno, anaerobio obbligato, rinvenuto nel suolo, nell'acqua e nell'intestino di vari mammiferi, uccelli e rettili (Post *et al*., 2001). Nell'uomo la presenza di CD e delle sue tossine è associata a casi di enterite che possono evolvere in gravi coliti pseudomembranose, osservate più frequentemente in pazienti ospedalizzati (Wilkins and Lyerly, 2003). Nella specie suina CD viene consideratola alcuni Autori la causa più frequente di enterite neonatale ed è responsabile di casi di mortalità osservati in scrofe trattate con antibiotici subito dopo il parto (Kiss and Bilkei, 2005; Songer and Anderson, 2006). Sebbene non sia stato dimostrata l'infezione dell'uomo con ceppi di origine suina, l'elevata prevalenza (46,7%) di CD riscontrata in preparazioni alimentari a base di carni suine, pone dei seri interrogativi sul potenziale rischio zoonosico che può derivare da questa specie (Songer *et al*., 2007; Rupnik 2007).

I maggiori fattori di virulenza di CD sono 2 esotossine ad attività citotossica: tossina A (enterotossina) e tossina B (citotossina). Esiste inoltre una terza tossina binaria che seppur priva di attività citotossica, è in grado di mediare la disgregazione del citoscheletro attraverso l'ADP-ribosilazione dei monomeri di actina (Voth and Ballard, 2005). La presenza delle tossine A e B può essere agevolmente evidenziata nel contenuto intestinale mediante test immunoenzimatici (ELISA) commercialmente disponibili, che dimostrano però sensibilità limitata (65-85%) e specificità variabile (95-100%) (Poutanen and Simor, 2004). L'identificazione biochimica di CD mediante kit commerciali risulta particolarmente indaginosa e spesso non offre risultati attendibili. Grazie all'introduzione di tecniche di biologia molecolare nell'identificazione batterica, è possibile determinare contemporaneamente la presenza di frammenti di DNA specie-specifici (*tpi,* triptose phosphate isomerase) e di geni che codificano per le tossine A e B (*tcd*A e

*tcd*B) (Lemee *et al*., 2004). Inoltre la presenza e la quantificazione di CD nelle feci è oggi possibile grazie a tecniche in Real-Time PCR (Penders et al., 2005).
L'elevata suscettibilità del suino lattante nei confronti di CD è da imputare all'assenza dell'effetto "barriera" esercitato dalla colonizzazione da parte della microflora competitiva a quest'età, associata, contrariamente a quanto avviene in altre specie, alla presenza sin dalla nascita di recettori maturi per le tossine di CD (Keel and Songer, 2007). Molti studi hanno dimostrato l'elevata prevalenza di CD e/o delle sue tossine nel contenuto intestinale o nelle feci di suini lattanti con diarrea (Songer *et al*. 2000; Yeager *et al*., 2002; Nagy and Bilkei, 2002; Nardi *et al*., 2005), ma poco si conosce circa il ruolo di questo microrganismo nell'eziologia delle enteriti osservate in soggetti di maggiore età.
Con il presente studio si è voluta indagare la diffusione di CD e delle sue tossine in campioni biologici di suini con sintomatologia gastroenterica o deceduti in seguito a questa, appartenenti a diverse fasi d'accrescimento. Sono stati confrontati vari metodi diagnostici quali l'esame batteriologico, la ricerca delle tossine mediante ELISA e la ricerca di *CD* nelle feci mediante Real-Time PCR.

MATERIALI E METODI

Campionamento
Sono stati esaminati 121 campioni costituiti da 12 tamponi rettali, 79 campioni di feci e 30 contenuti intestinali di soggetti con sintomatologia o lesioni all'apparato gastroenterico, provenienti da 31 allevamenti da reddito della Pianura Padana. In particolare sono stati prelevati campioni da 39 soggetti sottoscrofa, 13 in fase di svezzamento, 40 in fase di magronaggio, 26 in fase d'ingrasso e 3 scrofe. Dopo il prelievo, 28 campioni sono stati conservati in condizione di refrigerazione per non più di 72 ore, e sottoposti in giornata all'esame batteriologico, alla ricerca tossine mediante ELISA ed alla ricerca di *CD* mediante Real-Time PCR. 93 campioni, invece, sono stati congelati presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna e successivamente sono stati inviati a temperatura di refrigerazione alla sezione di Treviso dell'IZS delle Venezie, ove sono stati congelati e sottoposti successivamente ai medesimi accertamenti.

Esame batteriologico e tossinotipizzazione
I campioni sono stati inoculati in terreno liquido selettivo (TCCFB), addizionato con taurocolato di sodio per favorire la germinazione delle spore di *CD*; l'esame batteriologico è successivamente proseguito secondo quanto riportato in letteratura (Jousimies-Somer *et al*., 2002; Arroyo *et al*., 2005). In presenza di crescita batterica, sono state isolate colonie di bacilli Gram positivi, anaerobi obbligati da sottoporre ad identificazione biochimica mediante kit commerciale API ANA (BioMerieux). I ceppi di CD identificati biochimicamente e quelli per i quali non si è ottenuta un'identificazione accettabile, sono stati sottoposti a multiplex PCR in grado di evidenziare il gene specie-specifico *tpi* (triptose phosphate isomerase) di CD ed i geni *tcdA* e *tcdB* (Lemee *et al*., 2004).

Ricerca tossina A e B
Tutti i campioni sono stati sottoposti alla ricerca delle tossine A e B mediante saggio immunoenzimatico (*C. difficile* tox A/B II™, Techlab), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

Quantificazione di CD mediante Real-Time PCR
La Real-Time PCR specifica per CD è stata eseguita su 99 dei 121 campioni sottoposti all'esame batteriologico. Il DNA è stato estratto con l'utilizzo di un kit commerciale, da 200 mg di campione (feci e contenuto intestinale), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice (Qiamp DNA Stool mini kit, Qiagen) ed è stato successivamente amplificato secondo quanto riportato da Penders e coll. (2005).
Per i campioni risultati positivi si calcolava il numero di UFC/g di feci, mediante interpolazione dei valori dei ciclisoglia ottenuti su una curva di taratura allestita amplificando, con lo stesso protocollo, diluizioni scalari a titolo noto del ceppo di referenza ATCC 51697.

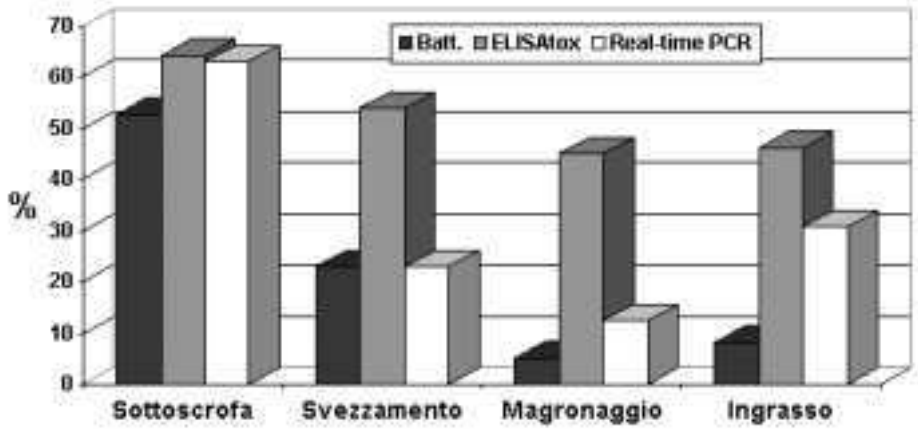
Ulteriori accertamenti diagnostici
I soggetti deceduti in seguito a sindromi gastroenteriche sono stati sottoposti ad esame necroscopico e, sulla base delle lesioni osservate e dell'età del soggetto, sono stati eseguiti accertamenti virologici, parassitologici e batteriologici generici. Da ciascun campione è stato ricercato *C. perfringens* ed i ceppi isolati sono stati successivamente sottoposti a PCR in grado di determinare la presenza di geni codificanti le tossine a, b1, e, i, b2 ed enterotossina (Yoo *et al*., 1997; Baums *et al*. 2004).

RISULTATI

Clostridium difficile è stato isolato da 27 (22,3%) campioni, provenienti da 11 (35,4%) allevamenti diversi, e 21 di questi sono risultati positivi anche alla ricerca tossine.
Tredici ceppi sono risultati portatori di entrambi i geni tossigeni (A^+B^+), un ceppo è risultato non tossigeno (A^-B^-) e altri 13 sono risultati positivi al solo gene codificante la tossina B (A^-B^+).
La più alta percentuale d'isolamento (61,5%) è stata ottenuta in campioni non sottoposti a congelamento e seminati in terreno selettivo entro 72 ore dal prelievo.
Le tossine sono state evidenziate nel 52,9% (64/121) dei campioni testati e di questi, 35 sono risultati positivi anche all'esame colturale e/o in Real-Time PCR.
Il 28,2% (28/99) dei campioni è risultato positivo a *CD* in Real-Time PCR e le cariche batteriche rilevate sono riportate in tabella 1. La maggiore prevalenza di *CD*, sia all'esame colturale che in Real-Time PCR, e delle sue tossine è stata riscontrata nei soggetti lattanti. Sono state sottoposte ad analisi anche tre scrofe con sintomatologia enterica e da due di queste è stato isolato *CD.* Le prevalenze per classi d'età, in relazione al metodo diagnostico considerato, vengono schematizzate in grafico 1.

Tab. 1. Concentrazione di CD nei campioni risultati positivi in Real-Time PCR.
Tab. 1. *Enumeration of CD in samples tested positive by Real-Time PCR.*

n° campioni	UFC/g di feci
21	<40
1	4,68 X 10^2
1	3,18 X 10^3
1	2,11 X 10^3
1	3,2 X 10^3
1	1,07 X 10^3
1	2,6 X 10^3
1	8 X 10^2



Graf. 1. Prevalenza di CD e delle sue tossine maggiori, in relazione alla fase d'accrescimento ed al metodo diagnostico adottato (Batt.: esame colturale; ELISAtox: ELISA tossina A e B; RT-PCR: Real-Time PCR).
Graph 1. *Prevalence of CD and of its main toxins with respect of the growing phase and of the diagnostic method considered (Batt: bacteriological examination; ELISAtox: enzyme immunoassay for CD toxin A and B).*

Tab. 2. Isolamento di CD da campioni positivi alla ricerca tossine, in relazione ad altri batteri enteropatogeni.
Tab. 2. *Enteropathogenic agents associated with CD and its main toxins.*

Presenza di CD in associazione ad altri patogeni enterici	n° campioni positivi
CD + tossine	1
CD + tossine + C. perfringens Tipo A	10
CD + tossine + C. perfringens Tipo A+β2	9
CD + tossine + C. perfringens Tipo A + Coli ETEC	1
CD + tossine + C. perfringens Tipo A + Campylobacter laridis	1

Da tutti i campioni positivi per *CD*, sia all'esame colturale che alla ricerca delle tossine, sono stati isolati altri batteri enteropatogeni. In particolare, 19 campioni su 22 sono

risultati positivi per *Clostridium perfringens* tossinotipo A o tossinotipo A+ β2 (tabella 2).
Nonostante l'elevata positività al test ELISA per la ricerca tossine, è da sottolineare il fatto che la maggiorparte di campioni presentava valori di OD di poco superiori al cut-off. Risulta pertanto interessante confrontare i risultati ottenuti abbinando al test ELISA un altro test in grado di rilevare la presenza di CD (tabella 3).

Tab. 3. Positività ottenute ai test singoli o diversamente abbinati (Sono considerati i 99 campioni esaminati contemporanemante con i tre metodi diagnostici adottati: esame batteriologico, PCR real time ed ELISA).
Tab. 3. *Number of samples tested positive according to the single diagnostic method or combinations of different diagnostic methods employed.*

Metodo diagnostico	n° campioni positivi
Es. batteriologico	16
ELISA tossine	51
Real-Time PCR	28
Es. batt. + ELISA tossine	9
Es. batt. + Real-Time PCR	11
ELISA tossine + Real-Time PCR	23
ELISA tossine + Real-Time PCR + Es. batt.	9

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano il frequente coinvolgimento di *CD* in episodi di enterite neonatale del suino, indipendentemente dal metodo diagnostico impiegato. L'elevata prevalenza (52,6%) riscontrata a quest'età conferma quanto già riportato in altri studi (Yeager *et al*., 2002; Nardi *et al*. 2005). La presenza di *CD* e delle sue tossine è stata riscontrata anche in alcuni soggetti in fase di svezzamento e ingrasso, sebbene in associazione ad altri batteri enteropatogeni, e particolarmente a *C. perfringens* tossinotipo A o A+β2 (tabella 2). Con un'unica eccezione tutti i ceppi di *CD* si sono dimostrati tossigeni; inoltre, i ceppi isolati da uno stesso allevamento appartenevano tutti al medesimo tossinotipo.
L'isolamento di 5 ceppi tossigeni in campioni risultati negativi alla ricerca tossine, può essere spiegata con la bassa sensibilità dei test immunoenzimatici, già riportata in letteratura (Poutanen and Simor, 2004), più che dalla mancata espressione delle tossine.
Infatti, la produzione di tossine è stata successivamente confermata applicando lo stesso test a terreni di coltura liquidi preventivamente inoculati con il ceppo da testare. Nonostante la ricerca delle tossine sia considerata il "gold test" nella diagnosi delle enteriti da *CD* (Songer and Uzal, 2005), nel corso della presente ricerca abbiamo potuto osservare che numerosi campioni di feci, negativi all'esame batteriologico, sono risultati positivi alla ricerca tossine con OD di poco superiori al cut-off.
E' possibile ritenere che la quantità di tossine fosse così bassa da non essere considerata responsabile della sintomatologia gastroenterica in atto o che si trattasse di reazioni aspecifiche. In questi casi l'abbinamento della PCR Real-Time, che oltretutto dimostra

una sensibilità superiore rispetto all'esame batteriologico, permette di interpretare rapidamente i risultati (tabella 3).
Il 61,5% dei campioni prelevati da soggetti sottoscrofa coltivati entro 72 ore dal prelievo, è risultato positivo all'esame batteriologico contro il 7% dei campioni sottoposti a congelamento e scongelamento. Questo dato conferma la necessità di una corretta conservazione del campione che deve essere processato entro 72 ore dal prelievo o congelato a –80 °C, senza subire sbalzi di temperatura. Alla luce di quanto osservato è necessario essere cauti nel formulare inferenze di tipo epidemiologico partendo da risultati di esami batteriologici condotti su campioni conservati in modo non ottimale.

Bibliografia

Arroyo L. G., Rousseau J., Willey B. M., Low D. E., Staempfly H., McGeer A., Weese J. S. (2005). "Use of a selective enrichment broth to recover Clostridium difficile from stool swabs under different conditions". J Clin Microbiol. 43, 5341-5343.

Baums C. G., Schotte U., Amtsberg G., Goethe R. (2004). "Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates". Vet Microbiol. 100, 11-16.

Jousimies-Somer H., Summanen P., Citron D. M., Jo Baron E., Wexler H. M., Finegold S. M.. (2002). "Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease". In: Wadsworth – KTL, Anaerobic bacteriology manual. Star publishing company, Belmont, California, pp. 133-141.

Keel M. K., Songer J. G. (2007). "The distribution and density of *Clostridium difficile* toxin receptors on the intestinal mucosa of neonatal pigs". Vet Pathol. 44, 814-822.

Kiss D., Bilkei G. (2005). "A new periparturient disease in Eastern Europe, *Clostridium difficile* causes postpartum sow losses". Theriogenology. 63, 17-23.

Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M., A., Maillard, K., Lemeland, J., F., Pons, J., L., 2004. "Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (toxin A), and *tcdB* (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*". J Clin Microbiol. 42:5710-5714.

Nagy J., Bilkei G. (2003). "Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit". Veterinary Journal. 166, 98-100.

Nardi M., Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2005). "Il *Clostridium difficile* nelle enteriti neonatali del suinetto: indagine in allevamenti della pianura padana". Atti XXXI Meeting annuale Sipas, pp. 531-538.

Penders J., Vink C., Driessen C., London N., Thijs C., Stobberingh E. (2005). "Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by Real-Time PCR". FEMS Microbiol lett. 243, 141-147.

Post K. W., Songer J. G., Jost B. H., Glock R. D., Holtcamp A. (2001). "The emergence of *Clostridium difficile* as a cause of porcine neonatal enteritis". In: Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians 2001, Des Moines, 373-376.

Pountanen S. R., Simor A. E. (2004). "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults." Can Med Assoc J. 171, 51-58.

Rupnik M. (2007). "Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease?". Clin Microbiol Infect. 13, 457-459.

Songer J. G., Post K. W., Larson D. J., Jost B. H., Glock R. D. (2000). “Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*”. Health Prod. 8, 185-189.
Songer J. G., Uzal F. A. (2005). “Clostridial enteric infections in pigs”. J Vet Diagn Invest. 17, 528-536.
Songer J. G., Trinh H. T., Thompson A. D., Killgore G. E., McDonald L. C., Limbago B. M. “Isolation of *Clostridium difficile* from retail meats”. In Proceeding of the second international *Clostridium difficile* symposium, Maribor 6-9 June 2007, pp. 44.
Voth D. E., Ballard J. D. (2005). “*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease”. Clin Microbiol Rev. 18, 247-263.
Wilkins T. D., Lyerly D. M. (2003). “*Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging”. J Clin Microbiol. 41, 531-534.
Yaeger M., Funk N, Hoffman L. (2002). “A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus”. J Vet Diagn Invest. 14, 281-287.
Yoo H. S., Lee S. U., Park K. Y., Park Y. H. (1997). “Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *C. perfringens* types by multiplex pcr”. J Clin Microbiol. 35, 228-232.

MESSA A PUNTO ED APPLICAZIONI PRELIMINARI DI UNA METODICA PER LA VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ IN VITRO DI BATTERI PATOGENI DEL SUINO NEI CONFRONTI DEGLI OLII ESSENZIALI

DEVELOPMENT AND PRELIMINARY APPLICATION OF A METHOD FOR IN VITRO SUSCEPTIBILITY TESTING OF BACTERIAL PATHOGENS OF SWINE ORIGIN VERSUS ESSENTIAL OILS

SPAGGIARI B.[1] GHERPELLI Y.[1], BONILAURI P.[1], MERIALDI G.[1]
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Reggio Emilia

Parole chiave. Olii essenziali – carvacrolo – MIC - suino – *Salmonella* Typhimurium – *Pasteurella multocida*
Key words. Essential oils – carvacrol – MIC – swine - *Salmonella* Typhimurium – *Pasteurella multocida*

Riassunto. Viene presentata la messa a punto di una metodica per la valutazione *in vitro* della sensibilità di vari ceppi di due importanti patogeni suini, *Salmonella* Typhimurium e *Pasteurella multocida*, nei confronti del carvacrolo, uno dei principali componenti dell'olio essenziale di origano (*Origanum vulgare*), di timo (*Thymus vulgaris*) e di altre specie botaniche. La valutazione dell'attività antimicrobica del carvacrolo è stata effettuata mediante la valutazione della minima concentrazione inibente la crescita batterica (MIC). Su tutti i ceppi testati di *P. multocida* la MIC del carvacrolo è risultata essere ≤0,0625%, mentre sui ceppi testati di *Salmonella* Typhimurium la MIC del carvacrolo è risultata essere variabile da 0,25% a 0,125%, confermando la spiccata attività antimicrobica *in vitro* di tale sostanza.

Abstract. A method is presented for testing *in vitro* susceptibility of different strains of 2 swine pathogens, *Salmonella* Typhimurium and *Pasteurella multocida*, to carvacrol, a major component of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*) and other plant essential oils. Carvacrol antimicrobial activity was evaluated by means of the minimum concentration inhibiting bacterial growth (MIC). On all tested strains of *P. multocida* carvacrol MIC was ≤0,0625%, while on tested strains of *Salmonella* Typhimurium carvacrol MIC varied from 0,25% to 0,125%. These results confirm the marked *in vitro* antimicrobial activity of carvacrol.

INTRODUZIONE

Le proprietà antisettiche delle piante aromatiche e medicinali e dei loro estratti sono state riconosciute fin dall'antichità, ma solo agli inizi del XX secolo si è iniziata la caratterizzazione delle loro proprietà in laboratorio mediante un approccio scientifico.

Nel 1881 Robert Koch effettuò un'indagine scientifica per misurare l'attività antisettica dell'olio di trementina verso il *Bacillus anthracis*. Vari ricercatori hanno in seguito studiato le caratteristiche degli olii essenziali derivati da piante e dei loro costituenti, dimostrandone l'attività antimicrobica e la capacità di stimolare il sistema immunitario, senza provocare effetti collaterali o secondari, né residui nei prodotti finali (Janssen et al. 1987, Recio et al. 1989, Jones 1996).
L'attività batteriostatica o battericida dell'olio essenziale di origano (OEO) è stata dimostrata nei confronti di diversi batteri patogeni, sia in vitro che in alimenti conservati (Sivropoulou et al. 1996, Koutsoumanis et al. 1999). Le analisi chimiche effettuate sull'OEO hanno dimostrato tra i suoi principali componenti vi sono i composti fenolici carvacrolo e timolo, a spiccata attività antimicrobica (Demetzos and Perdetzoglou 2001).
Per poter valutare l'attività antimicrobica del carvacrolo nei confronti di alcuni patogeni del suino isolati in corso di patologia respiratoria ed enterica presso i nostri Laboratori, si è messa a punto una metodica di MIC modificata per le peculiari caratteristiche fisico-chimiche dell'olio essenziale.

MATERIALI E METODI

Campioni

Dieci ceppi di *Salmonella* Typhimurium e 10 ceppi di *Pasteurella multocida* sono stati isolati mediante gli esami colturali effettuati su matrici di origine suina (visceri, feci) nel Laboratorio di Diagnostica Generale dell'IZSLER, Sezione di Reggio Emilia. I ceppi di *Salmonella* Typhimurium sono stati ottenuti da intestino o feci di suino, da cui si è proceduto ad un arricchimento in acqua peptonata a 37°C per 24h, seguito da semina su terreno MSRV ed incubazione a 41.5°C per 24-48h. I ceppi di *Pasteurella multocida* sono stati ottenuti da polmoni di suino mediante semina su agar globuli ed incubazione a 37°C per 24h. Una volta isolati, i ceppi batterici sono stati mantenuti nel terreno Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid) in becco di clarino a +4°C.

Prova di sensibilità mediante microdiluizione in brodo - MIC

Il carvacrolo è stato fornito dalla ditta Eurhema del gruppo Soda – Feed Ingredients, Monaco.
La determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) del carvacrolo è stata effettuata utilizzando il metodo di microdiluizione in brodo, analogamente a quanto descritto dal National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1990), con l'apporto di alcune modifiche e riferendosi anche al protocollo di Carson et al. (1995).
Tutte le prove di sensibilità sono state effettuate utilizzando il brodo BHI addizionato di Tween 80 (Merck) ad una concentrazione finale dello 0.5% (V/V) (BHIT) e di trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (Aldrich) ad una concentrazione finale dello 0.005%. L'olio essenziale è stato preventivamente diluito 1:3 in etanolo 96% e successivamente 1:2 in BHIT più TTC. La sospensione batterica è stata ottenuta da una brodocoltura

(BHI) di 18h portata alla densità di $5x10^5$ UFC/ml, diluendo 1:100 una sospensione 0,5 McFarland. Si sono poi allestite diluizioni seriali dell'olio a partire dal 4% per giungere al 0,0625%, alle quali sono state aggiunti volumi costanti di sospensione batterica. In ogni prova è stato incluso un controllo positivo di crescita batterica incubando la sospensione batterica con BHIT più TTC in assenza dell'olio essenziale ma con la stessa concentrazione finale di etanolo 96%. Le piastre sono state chiuse con coperchio sterile ed incubate per 24h a 37°C. Per la lettura della MIC, si è proceduto alla valutazione della più bassa concentrazione di olio essenziale espressa come percentuale volume/volume in grado di inibire la crescita batterica. Avendo utilizzato il TTC per ovviare all'impossibilità di lettura causata dalla torbidità del terreno di coltura, la presenza di crescita era evidenziata dalla comparsa di una colorazione rossa (Foto 1).

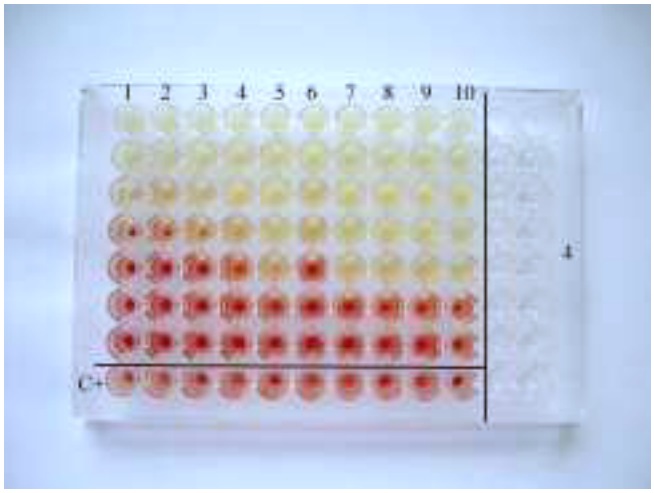


Fig. 1. Piastra multiwell con l'allestimento della metodica di MIC modificata per olii essenziali. Ad ogni numero corrisponde un diverso olio essenziale. I pozzetti colorati in rosso sono quelli con crescita batterica.
Fig. 1. *Multiwell plate with the modified MIC method for essential oils. A different essential oil correspond to each number. Red wells present bacterial growth.*

RISULTATI

Sui ceppi testati di *Salmonella* Typhimurium la MIC del carvacrolo è risultata essere variabile da 0,25% a 0,125%. Su tutti i ceppi testati di *P. multocida* la MIC del carvacrolo è risultata essere ≤0,0625%. (Tabella A).

Tab. A. Risultati della MIC del carvacrolo nei confronti dei ceppi di *Salmonella* Typhimurium e *Pasteurella multocida* testati.
Tab. A. *Results of carvacrol MIC for tested strains of Salmonella Typhimurium and Pasteurella multocida.*

N°	Ceppo batterico	Origine	MIC carvacrolo % v/v
1	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,12
2	*Salmonella* Typhimurium	Intestino di suino	0,125
3	*Salmonella* Typhimurium	Intestino suino	0,125
4	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,25
5	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,125
6	*Salmonella* Typhimurium	Intestino suino	0,25
7	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,25
8	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,125
9	*Salmonella* Typhimurium	Feci di suino	0,125
10	*Salmonella* Typhimurium	Intestino di suino	0,25
1	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
2	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
3	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
4	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
5	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
6	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
7	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
8	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
9	*Pasteurella multocida*	Polmone di suino	≤0,0625
10	Pasteurella multocida	Polmone di suino	≤0,0625

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La determinazione della MIC coinvolge una procedura semi-quantitativa che fornisce un'approssimazione della più bassa concentrazione di antimicrobico necessaria a prevenire la crescita batterica (Lambert and Pearson 2000).
La natura idrofobica e la conseguente insolubilità dell'olio essenziale in un *medium* standard di crescita batterica ha rappresentato un serio impedimento alla valutazione dell'attività antimicrobica del carvacrolo. Per contrastare la limitata solubilità dell'olio in mezzo acquoso l'olio è stato sottoposto a diluizione 1:3 con etanolo 96%, seguita da diluizioni seriali successive in BHI contenente Tween 80 come agente surfattante. L'uso del Tween 80 ha fatto aumentare la solubilità dell'olio nel brodo di coltura, ma la persistente torbidità dell'olio solubilizzato comunque impediva la determinazione visiva della MIC. Una soluzione al problema è stata ottenuta aggiungendo un indicatore di crescita batterica come il trifeniltetrazolio cloruro, che viene metabolizzato dalla deidrogenasi dai microrganismi presi in esame con formazione di una sostanza rossa insolubile, il formazano.
Osservazioni preliminari permettono di rilevare come la presente metodica sia utilizzabile anche per diversi altri componenti di olii essenziali (cinnamica, timolo, geraniolo, eugenolo).
La messa a punto di una metodica di MIC modificata per l'utilizzo di olii essenziali è stata eseguita e perfezionata per l'importante potenziale di utilizzo che questi metaboliti secondari delle piante aromatiche e medicinali possiedono in ambito farmaceutico e fitoterapico, cosmetico, medico ed alimentare.

In bibliografia è riportata la maggiore attività antimicrobica degli olii contenenti un'alta percentuale di composti fenolici, tra cui gli stessi carvacrolo e timolo (Peñalver et al. 2005). L'attività antimicrobica di carvacrolo e timolo si esplicherebbe in un danno all'integrità della membrana cellulare batterica (Helander et al. 1998, Lambert et al. 2001). Ultee et al. (2000) hanno dimostrato come il carvacrolo modifichi la composizione in acidi grassi nel doppio strato fosfolipidico di *Bacillus cereus*.
L'utilizzo degli olii essenziali come conservanti alimentari naturali sta suscitando un crescente interesse. Vari composti derivati da olii essenziali dimostrano infatti un'attività inibitoria nei confronti di numerosi batteri alteranti e responsabili di tossinfezioni alimentari, nonché su miceti filamentosi alteranti e micotossigenici, lieviti patogeni e virus animali e vegetali (Knobloch et al. 1989, Friedman et al. 2002). Come conservanti naturali, gli olii potrebbero ritardare la contaminazione microbica e ridurre l'instaurarsi del deterioramento delle derrate alimentari, anche in virtù delle loro notevoli proprietà antiossidanti.
In ambito zootecnico, le restrizioni all'uso degli antibiotici come promotori di crescita durante gli ultimi anni hanno incoraggiato l'uso degli oli essenziali. Per le loro proprietà digestive, appetibilizzanti e regolatorie del metabolismo gastroenterico, secondo vari Autori gli additivi a base di OEO influenzano positivamente l'assunzione giornaliera di alimento, l'incremento ponderale giornaliero e l'indice di conversione dell'alimento di suini in accrescimento, consentendo un notevole aumento della digeribilità e dell'assorbimento di nutrienti (Günter and Bossow 1998, Costa et al. 1999, Bilkei and Gertenbach 2001, Khajarern and Khajarern 2002). Attualmente gli olii essenziali sono addizionati ai mangimi zootecnici con lo *status* di additivi aromatizzanti.
Friedman et al. (2002) hanno mostrato come carvacrolo, timolo, cinnamaldeide ed eugenolo presentino spiccata attività antimicrobica verso ceppi di *E.coli*, *Salmonella enterica* e *L. monocytogenes*. Amrik e Bilkei 2004 e Si et al. (2006) specificano inoltre come queste molecole non interferiscano con la normale flora enterica del suino, ma anzi la stabilizzino controllando i dismicrobismi.
Il presente lavoro, lungi dal volere avallare un utilizzo alternativo degli olii essenziali rispetto agli antibiotici, fornisce un contributo tecnico alla valutazione della loro attività antimicrobica *in vitro*. A parere degli Autori resta ancora molto da indagare sull'effetto antimicrobico degli olii essenziali in campo; in particolare molto è ancora da chiarire sui loro meccanismi d'azione, sulla loro cinetica e sulla correlazione tra MIC e dose di inclusione nell'alimento.

BIBLIOGRAFIA

Amrik B., Bilkei G. (2004) "Influence of farm application of oregano on performances of sows". Can. Vet. 45, 674-677.

Bilkei G., Gertenbach W. (2001) "Retrospektive Untersuchung des Kombinationseffektes hoher Vitamin E- und pflanzicher Oregano- Futterzusätze auf die entwicklung von verzögert wachsenden Mastschweinen". Biol. Tiermed. 3, 83-87.

Carson C.F, Hammer K.A., Riley T.V. (1995) "Broth microdiluition method for determinin the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the essential oil of *Melaleuca*

alternifolia (tea tree oil)". Microbios. 82, 181-185.
Costa P., Salado S., Medel P., Asensio J.J. (1999) "Productos naturales de origen vegetal: una alternativa a los aditivos antimicrobianos en alimentacion animal". Anaporc 190, 51-57.
Demetzos C., Perdetzoglou D.K. (2001) "Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece". J. Essential Oil Res. 13, 460-462.
Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. (2002) "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Camplylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*". J. Food Protect. 65, 1545-1560.
Günter K. D., Bossow H. (1998) "The effect of the etheric oil from *Origanum vulgaris* (Ropadiar®) in the feed ration of weaned pigs on their daily feed intake, daily gains and food utilization". Proceedings of the 15th Int Pig Vet Soc Congr, Birmingham, 223.
Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., von Wright A. (1998) "Characterization of the action of essential oil components on Gram-negative bacteria". J. agric. food chem.. 46, 3590-3595.
Janssen M.A., Scheffer J.J.C., Svendsen A.B. (1987) "Antimicrobial activities of essential oils: a 1976-86 literature review on possible applications". Pharmaceutische Weekblad (Scientific Edition) 9, 193-197.
Jones F.A. (1996) "Herbs – useful plants. Their role in history and today". Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 8, 1227-1231.
Khajarern J., Khajarern S. (2002) "The efficacy of origanum essential oils in sow feed". Int. Pig Topics 17, 17.
Knobloch K., Pauli A., Iberl L., Weigand N., Weis H.M. (1989) "Antibacterial and antifungal properties of essential oil components". J. Essential Oil Res. 1, 119-128.
Koch R. (1881) "Untersuchung von pathogen Organismen". Mitt. Kaiserl Gesundh. Amt I, 234.
Koutsoumanis K., Lambropoulou K., Nychas G.J.E. (1999) "A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis in a food model system supplemented with a natural antimicrobial". Int. J. Food Microbiol. 49, 67-74.
Lambert R.J.W., Pearson J. (2000) "Susceptibility testing; accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values". J. Appl. Microbiol. 88, 784-790.
Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E. (2001) "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol". J. Appl. Microbiol. 91, 453-462.
Peñalver P., Huerta B., Borge C., Astorga R., Romero R., Perea A. (2005) "Antimicrobial activity of five essential oils against strains of the *Enterobacteriaceae* family". APMIS 113, 1-6.
Recio M.C., Rios J.L., Villar A. (1989) "Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area". Phytotherapy Res. 3, 77-80.
Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R, Du Z. (2006) "Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria". J. Appl. Microbiol. 100, 296-305.
Sivropoulou A., Papanikolau E., Nikolau C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996) "Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils". J. Agric. Food Chem. 44, 1201-1205.
Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A., Smid E.J. (2000) "Adaptation of the food-borne pathogen Bacillus cereus to carvacrol". Arch. Microbiol. 174, 233-238.

INDAGINE IMMUNOISTOCHIMICA SULLA EZIOLOGIA DELLA POLMONITE PROLIFERATIVA E NECROTIZZANTE (PNP) DEL SUINO IN ITALIA: RISULTATI PRELIMINARI

IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION ON SWINE PROLIFERATIVE AND NECROTIZING PNEUMONIA (PNP) IN ITALY: PRELIMINAR RESULTS

FEDERICO MORANDI, FABIO OSTANELLO, LAURA FUSARO, BARBARA BACCI, ARRIGO NIGRELLI[1], LORIS ALBORALI[2], MICHELE DOTTORI[3], FAUSTO VEZZOLI[4], GIUSEPPE BARIGAZZI[5], LAURA FIORENTINI[6], VITTORIO SALA[7], GIORGIO LEOTTI[8], GIUSEPPE SARLI

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna – IZS Lombardia e Emilia Romagna sezioni diagnostiche di Mantova[1], Brescia[2], Reggio Emilia[3], Lodi[4], Parma[5], Forlì[6] - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano[7] - Merial Italia[8]

Parole chiave: suino, immunoistochimica, PCV2, PRRSV, PNP
Key words: pig, immunohistochemistry, PCV2, PRRSV, PNP

Riassunto. La polmonite necrotizzante proliferativa (PNP) è una delle "malattie da circovirus" (PCVD) che colpisce il suino in svezzamento e post-svezzamento. Si tratta di polmonite interstiziale a cui sono associati ipertrofia ed iperplasia degli pneumociti di II tipo e presenza di materiale necrotico che occupa gli alveoli. L'eziologia vede il PRRSV ed il PCV2, da soli o in associazione, come gli agenti eziologici più probabili. Su 24 polmoni con PNP, selezionati da un campione ottenuto nell'ambito di uno studio per l'applicazione di un protocollo per la diagnosi della PMWS, sono state applicate metodiche immunoistochimiche per mettere in evidenza PRRSV e PCV2 nel contesto delle lesioni nel tentativo di evidenziare il ruolo eziologico che questi due virus possono avere nel determinismo della PNP in Italia. I risultati sono stati i seguenti: in 7 polmoni è stata evidenziata una co-infezione PCV2 - PRRSV, 9 polmoni sono risultati positivi al solo PRRSV, 4 sono risultati positivi al solo PCV2, mentre in 4 polmoni non è stata messa in evidenza la presenza di nessuno dei due virus. Tali risultati farebbero attribuire al PRRSV un ruolo più importante nel determinismo della PNP rispetto al PCV2 negli allevamenti italiani, ma la coinfezione è risultata associata ai quadri istolesivi più gravi.

Summary. Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) is a particular form of interstitial pneumonia in weaning and post-weaning pigs characterized by hypertrophy and hyperplasia of type II pneumocytes and presence of coagulative necrosis and granular debris within alveolar spaces. American and European studies suggest PRRSV and PCV2 as the probable causes of the disease. An immunohistochemical study was carried out on 24 PNP lungs to evaluate the role of PRRSV and PCV2 in PNP lesions in Italy. Results were as follows: co-infection (PCV2 and PRRSV) in 7 PNP lungs,

PRRSV only in 9, PCV2 only in 4, and neither of the two antigens was found in the remaining 4. These findings support the major role of PRRSV as cause of PNP in Italy, even if co-infection is characterized by more severe histological aspects.

Introduzione

La polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) è stata descritta per la prima volta in Canada nel 1990 (Morin et al., 1990) come una patologia del suino in svezzamento e post-svezzamento con un picco fra le 4 e le 16 settimane di vita. La PNP è oggi inserita fra le "malattie da circovirus" (PCVD) del suino insieme alla sindrome dermatite-nefrite del suino (PDNS), al complesso delle malattie respiratorie (PRDC), alla linfadenite necrotizzante ed enterite granulomatosa e ad alcuni disordini riproduttivi (Harding, 2004; Segalés et al., 2004). Macroscopicamente, è caratterizzata da un aumento di consistenza dei polmoni che non collassano e mostrano un colore da rosso-bruno a grigiastro con lesioni prevalentemente localizzate nei lobi craniali e medi e nelle porzioni cranio-ventrali dei lobi caudali (Morin et al., 1990). I reperti istologici mostrano materiale necrotico e detriti cellulari intralveolari ed un diverso grado di iperplasia ed ipertrofia degli pneumociti di II tipo (Morin et al., 1990; Larochelle et al., 1994; Drolet et al., 2003; Segalés et al., 2004). Questi due aspetti si rilevano costantemente in un contesto di polmonite interstiziale di varia gravità con presenza o meno di bronchiolite necrotizzante e/o broncopolmonite che ne complicano il quadro.

L'eziologia di questa entità patologica non è ancora ben chiara. Il primo agente chiamato in causa in studi canadesi (Morin et al., 1990; Austin and Bystrom, 1991; Dea et al., 1992; Girard et al., 1992) è stato il virus dell'influenza suina (SIV). Nel 1994 Larochelle et al. hanno ipotizzato che le lesioni della PNP fossero causate dal PRRSV dimostrando in 28 polmoni su 38 la presenza di quest'ultimo ed in uno solo caso la presenza di SIV, mentre in 9 polmoni non è stato evidenziato nessun agente eziologico conosciuto. Successivamente, gli stessi Autori americani (Drolet et al., 2003) ed Autori europei (Pesch et al., 2000; Grau-Roma e Segalés, 2007) hanno evidenziato una frequente coesistenza di due virus (PRRSV e PCV2) in polmoni con PNP. Tuttavia, i risultati ottenuti da Autori americani ed europei hanno mostrato qualche differenza. I primi hanno evidenziato costantemente, in corso di PNP il PRRSV, che nel 42% dei casi era co-presente con PCV2 e mai quest'ultimo come solo agente eziologico. Gli altri (Grau-Roma e Segalés, 2007) hanno descritto in un totale di 74 casi di PNP la presenza del solo PCV2 in 29 casi, l'associazione PCV2-SIV in 3, la co-presenza PCV2-ADV (*Aujeszky's disease* virus) in un solo caso, PCV2-PRRSV in 30 ed il solo PRRSV in 3 casi. D'altra parte in entrambi gli studi in una certa percentuale di polmoni con PNP (rispettivamente il 7 ed il 10%) non è stata rilevata la presenza di nessun agente eziologico tra quelli indagati. Perciò tali risultati, oltre ad evidenziare un comportamento ed un ruolo diverso dei virus considerati nell'insorgenza della PNP nei due differenti contesti continentali, lasciano ancora molti spazi di approfondimento e di studio.

A tale scopo, nell'ambito di un progetto promosso da Merial Italia che opera dal giugno del 2006 per l'applicazione di un protocollo per la diagnosi della PMWS (*post-weaning multisystemic wasting syndrome*) in allevamenti del nord e centro Italia (Sarli et al., 2007), sono stati selezionati, da 217 suini, 24 polmoni con PNP. I polmoni in oggetto sono stati sottoposti ad un'indagine immunoistochimica oltre che per PCV2 anche per PRRSV in modo da raccogliere dati preliminari utili a verificare l'eventuale ruolo di questi due virus nella eziologia della PNP negli allevamenti italiani.

Materiali e Metodi

La revisione delle lesioni riscontrate nei polmoni di 217 suini campionati nell'ambito dell'applicazione di un protocollo per la diagnosi della PMWS (Sarli et al., 2007), ha consentito di selezionare 24 casi (già disponibili come sezioni di materiale fissato in formalina, incluso in paraffina e colorato con ematossilina-eosina) di polmonite con caratteri istologici di PNP. Per tutte era anche disponibile la colorazione con metodica immunoistochimica per PCV2 secondo quanto già riferito (Sarli et al., 2007). Sono state allestite, per ognuno dei 24 casi, ulteriori sezioni sottoposte a colorazione immunoistochimica (IHC) per PRRSV. L'indagine IHC per PRRSV è stata eseguita su sezioni di 4 micron utilizzando un anticorpo monoclonale (IgG1 di topo, clone SDOW17-A, Rural Technology, Incorporated, Brookings, South Dakota). Brevemente: le sezioni sono state sparaffinate e reidratate; le perossidasi endogene sono state bloccate con perossido di idrogeno al 3% in acqua distillata per 30'; successivamente, sono state sottoposte a preincubazione con "Protein block serum free" (DAKO X0909) per 10' a temperatura ambiente; le sezioni sono state incubate "over night" con l'anticorpo primario diluito 1:50; una volta lavate in tampone TRIS 0,15M, sono state incubate con anticorpo secondario e, successivamente, con il complesso streptavidina-biotina-perossidasi (DAKO LSAB kit peroxidase) entrambi per 15'. La reazione è stata evidenziata utilizzando diaminobenzidina (0,04% per 10') come cromogeno. Infine le sezioni sono state contrastate utilizzando ematossilina di Papanicolau, disidratate e montate con DPX. Come controllo positivo è stato utilizzato polmone di un suino risultato positivo alla PCR, per la ricerca del genoma di PRRSV-. Come controllo negativo sullo stesso tessuto è stato impiegato un anticorpo dello stesso isotipo dell'anticorpo primario (IgG1), ma di irrilevante specificità.

Risultati

Caratteri istologici comuni nei casi selezionati erano, in un contesto di polmonite interstiziale da focale a diffusa caratterizzata da infiltrato macrofagico e linfoplasmacellulare, prevalentemente alveolo-settale: (1) ipertrofia ed iperplasia degli pneumoniti di II tipo e (2) presenza di stampi intralveolari di materiale necrotico più o meno abbondante che occasionalmente presentava aggregati basofili, espressione di una intensa cariolisi. Solo 4 polmoni mostravano una focale necrosi bronchiolare e 12 una broncopolmonite

che complicava il quadro di polmonite interstiziale. Complessivamente, dei 24 polmoni con PNP, 19 (79,17%) appartenevano a suini provenienti da allevamenti in cui era stata diagnosticata PMWS secondo il protocollo applicato (Sarli et al., 2007), mentre 5 erano casi non riferibili ad allevamenti con diagnosi di PMWS. L'IHC per PCV2 ha evidenziato una positività da lieve a marcata in 11 casi (il 45,83% di tutti i polmoni con PNP ed il 57,9% di quelli appartenenti ad allevamenti con PMWS). Nei casi con segnale marcato, era intracitoplasmatico, nei macrofagi sia alveolo-settali che intralveolari, nelle cellule dendritiche del tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT), occasionalmente nel materiale necrotico intralveolare ed in un solo caso in rari pneumociti ipertrofici. Nei casi con più debole espressione erano positive le cellule dendritiche del BALT e rari istiociti alveolo-settali. Nei 4 polmoni in cui era presente una focale necrosi bronchiolare, il segnale per il PCV2 era molto intenso nell'infiltrato infiammatorio macrofagico e mancava nell'epitelio bronchiolare. L'idagine IHC per PRRSV ha mostrato positività nel complesso più debole, da lieve a moderata e da focale a multifocale, in 15 polmoni (62,5% del totale). Il segnale, sempre nei campi di PNP, si osservava nel citoplasma di pneumociti ipertrofici ed iperplastici, e nel citoplasma di alcuni macrofagi alveolo-settali. Più in dettaglio, come riportato in tabella 1, in 7 polmoni (il 29,16% del totale) era presente una co-infezione PRRSV-PCV2. Al contrario, mentre in 4 polmoni è stato evidenziato il solo PCV2, 9 mostravano positività IHC solo per PRRSV (37,5% del totale) di cui 5 di allevamenti non-PMWS e 4 di allevamenti con PMWS. Infine, in 4 casi di PNP (16,7% del totale) non è stata osservata positività né per PCV2 né per PRRSV.

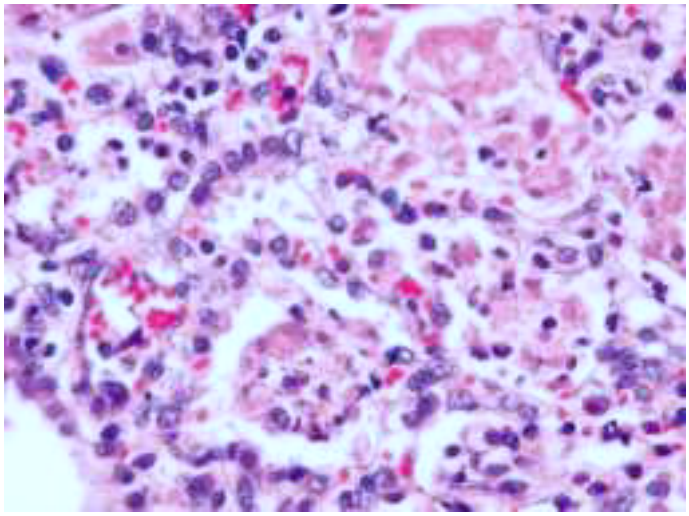


Fig. 1. Suino. Polmone. La sezione mostra ipertrofia ed iperplasia degli pneumociti di II tipo e materiale necrotico intralveolare. L'interstizio mostra un lieve infiltrato infiammatorio mononucleato, E&E. 40x.
Fig. 1. *Swine. Lung. Hypertrophy and hyperplasia of type II pneumocytes and necroticintralveolar debris associated with mild lymphocyte infiltration the interstitium, H&E. 40x.*

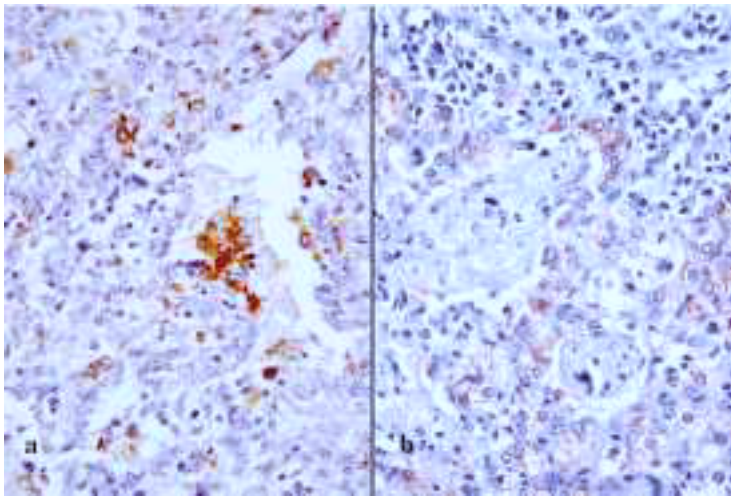


Fig. 2. Suino. Polmone. a: Intensa reazione immunoistochimica positiva per PCV2 del citoplasma di alcuni macrofagi alveolo-settali e del materiale necrotico intralveolare. 40x. b: Debole reazione immunoistochimica positiva per PRRSV nel citoplasma degli pneumociti di II tipo.
Fig. 2. *Swine. Lung. a: intense IHC cytoplasmic positivity for PCV2 in macrophages of alveolar septa and in necrotic intra-alveolar material. 40x. b: mild IHC positivity for PRRSV in the cytoplasm of type II pneumocytes. 40x.*

Tab. 1. Risultati dell'indagine immunoistochimica per PRRSV e PCV2 in 24 polmoni di suino con PNP, di cui 19 provenienti da allevamenti con diagnosi di PMWS e 5 da allevamenti negativi per PMWS. In 7 polmoni (il 29,16% del totale) era presente una co-infezione PRRSV-PCV2. In 4 polmoni è stato evidenziato il solo PCV2 (16,7% del totale), in 9 solo il PRRSV (37,5% del totale) di cui 5 di allevamenti non-PMWS e 4 di allevamenti con PMWS. Quattro casi (16,7% del totale) erano negativi per entrambi i virus.
Tab. 1. *Results of immunohistochemistry to PRRSV and PCV2 in 24 swine lungs with PNP: 19 lungs were from PMWS and 5 from non-PMWS farms. Seven lungs (29.16%) showed PRRSV-PCV2 co-infection, 4(16.7%) PCV2 only, and 9 (37.5%) PRRSV only (4 from PMWS and 5 from non-PMWS farms). Four cases (16.7%) were negative for both viruses.*

	PNP in allevamenti con PMWS		PNP in allevamenti senza PMWS e PCV2-
	PCV2+	PCV2-	
PRRSV+	7	4	5
PRRSV-	4	4	0

Discussione

I virus sospettati di essere responsabili della PNP sono, oltre al PRRSV e il PCV2, anche il SIV (Grau-Roma e Segalés, 2007; Drolet et al., 2003; Pesch et al., 2000) e l'ADV, al quale in Spagna è stata attribuita una responsabilità di lesioni polmonari a carattere necrotizzante (Grau-Roma e Segalés, 2007; Segalés et al., 1997). Essendo PRRSV e PCV2 i due virus a cui viene riconosciuto il ruolo principale nel determinismo della PNP, essi sono stati oggetto di questa indagine preliminare, senza comunque voler trascurare gli altri agenti eziologici in approfondimenti futuri.

Considerando che lo studio si è sviluppato su un campionamento eseguito in allevamenti con anamnesi di PMWS e che la maggior parte dei casi vengono da allevamenti con diagnosi conclusiva di PMWS, l'analisi dei risultati non potrà quindi prescindere da questo aspetto che per primo ne condiziona l'appartenenza di 19 polmoni con PNP a suini di allevamenti con PMWS e solo 5 ad allevamenti non-PMWS.
D'altra parte, nonostante questa possibile distorsione, mentre in 9 polmoni (tabella 1) è stato evidenziato il solo PRRSV solo in 4 (tutti in polmoni di suini appartenenti ad allevamenti con PMWS) il PCV2 sembra essere l'unico presente dei due agenti indagati. I risultati del presente lavoro concordano sia con ricerche canadesi (Drolet et al., 2003) che europee (Grau-Roma e Segalés, 2007; Pesch et al., 2000) sul fatto che entrambi i virus in oggetto sembrano avere un ruolo nella eziologia della PNP (11 polmoni mostrano confezione). D'altra parte i nostri risultati si avvicinano maggiormente a quelli canadesi che riconoscerebbero un ruolo maggiore al PRRSV in quanto è più costante il suo riscontro nelle lesioni, piuttosto che quelli europei che vedrebbero il PCV2 come agente maggiormente coinvolto in questa patologia polmonare. La considerazione andrebbe però confermata anche in funzione di un campionamento in cui la PNP sia disgiunta dalla PMWS (solo 5 evenienze nella nostra casistica), come presumibilmente è accaduto negli studi già pubblicati. Al contrario, nonostante la nostra indagine abbia previsto la ricerca di soli due agenti eziologici, quello che accomuna i lavori citati ed il nostro è il riscontro di un certo numero di polmoni in cui non è stata rilevata la presenza di alcun virus indagato che lascia aperte ancora molte strade di approfondimento: 8 su 74 (10,8%, in Grau-Roma e Segalés, 2007), 4 su 60 (7%, in Drolet et al., 2003), 4 su 24 (16,67%, nel presente studio).
La percentuale leggermente maggiore nei nostri dati potrebbe essere attribuita al minor numero di agenti indagati. Altre considerazioni vanno condotte sulla localizzazione della positività immunoistochimica. Infatti, mentre il PRRSV, quando presente, era prevalentemente localizzato nel citoplasma degli pneumociti ipertrofici, il PCV2 era evidenziabile nel citoplasma di macrofagi alveolo-settali, in 4 casi in macrofagi alveolari ed in un solo caso in rari pneumociti ipertrofici. Questo potrebbe suggerire un importante ruolo del PRRSV nell'espressione morfologica dell'ipertrofia degli pneumociti, mentre del PCV2 nell'espressione della necrosi. Questo ruolo del PCV2 sarebbe anche confermato dal riscontro di bronchiolite necrotizzante ed abbondante materiale necrotico intralveolare in quei casi in cui l'IHC ha evidenziato un'alta carica virale di PCV2, dati che concordano con quanto riportato anche da Drolet et al. (2003) e Grau-Roma e Segalés (2007.
Allo stesso modo, è ampiamente descritta ipertrofia ed iperplasia di pneumociti di II tipo in patologie polmonari in suini CD/CD (cesarean-derived, colostrum-deprived) indotte dal solo PRRSV inoculato sperimentalmente (Beyer et al., 1998; Halbur et al., 1996, Halbur et al., 1995). È d'altra parte noto, ancora una volta in studi sperimentali (Harms et al., 2001), come la coinfezione dei due virus in oggetto sia causa di quadri polmonari più gravi di quanto non avvenga nell'infezione dell'uno o dell'altro singolarmente.

Conclusioni

In base ai risultati della nostra indagine, la PNP è presente in Italia e non è solo una manifestazione pneumonitica riscontrabile nel contesto della PMWS. I risultati emersi globalmente dimostrano una maggiore presenza di PRRSV nelle lesioni rispetto al PCV2, anche se la co-infezione sembra legata a quadri istolesivi più gravi.

Bibliografia

Austin R., Bystom J. (1991) "Proliferative and necrotizing pneumonia in Manitoba". Can Vet J. 32: 371.

Beyer J., Fitchner D., Schirrmeier H., Granzow H., Polster U., Weiland E., Berndt A., Wege H. (1998) „Arterivirus PRRSV. Experimental stidies on the pathogenesis of respiratory disease". Adv Exp Med Biol. 440: 593-599.

Dea S., Bilodeau R., Sauvageau R., Montpetit C., Martineau G.P. (1992) "Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs". J Diagn Invest. 4: 380-392.

Drolet R., Larochelle R., Morin M., Delisle B., Magar R. (2003) "Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia". Vet Pathol. 40: 143-148.

Girard C., Morin R., EIAlzhary Y. (1992) "Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus". Vet Rec. 130: 206-207.

Grau-Roma L., Segalés J. (2007) "Detection of porcine reproductive and respiratory sindrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necritizing pneumonia(PNP) in Spain". Vet Micr. 119: 144-151.

Halbur P.G., Miller L.D., Paul P.S., Meng X.J., Huffmann E.L., Andrews J.J. (1995) "Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs". Vet Pathos. 32: 200-204.

Halbur P.G., Paul P.S., Meng X.J., Lum M.A., Andrews J.J., Rathje J.A. (1996) "Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in five-week-old cesarean-derived, colostrums-deprived pig model". J Vet Diagn Invest. 8: 11-20.

Harding J.C.S. (2004) "The clinical expession and emergence of porcine circovirus 2". Vet Micr. 98: 131-135.

Harms P.A., Sorden S.D., Halbur P.G., Bolin S.R., Lager K.M., Morozov I., Paul P.S. (2001) "Experimenta reproduction of severe disese in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Vet Pathol. 38: 528-539.

Lorochelle R., Sauvageau R., Magar R. (1994) "Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec". Can Vet J. 35: 513-515.

Morin M., Girard C., Eiazhary Y., Fajardo R., Drolet R., Lagacé A. (1990) "Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease". Can Vet J. 31: 837-839.

Pesch S., Schmidt U., Ohlinger V.F. (2000) "Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) is a result of co-infection with porcine reproductive and respiratory disease (PRRSV) and porcine

circovirus type 2 (PCV2)". In: Proceedings of IPVS Congress. 16: 581.
Segalés J., Balasci M., Domingo M., Carvalho L.F., Pijoan C. (1997) "Immunohistochemical demostration of the spread of pneumotrospic strani 4892 of Aujezsky's disease virus in conventional pigs". J Comp Pathol. 116: 387-395.
Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease". Vet Micr. 98: 137-149.
Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Sala. V., Leotti G. (2007) "Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS". Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. XXXIII Meeting Annuale 189-202.

DISCOMFORT E ULCERA GASTRICA DEL SUINO: IL SIGNIFICATO DELLA CONTEMPORANEA PRESENZA DI PRRSV E PCV2

DISCOMFORT AND GASTRIC ULCER IN PIGS: MEANING OF BOTH PRRSV AND PCV2 PRESENCE

SENSI M.[1], MOSCATI L.[2], CROTTI S.[1], PELA M.[2], PAOLONI A.[2], BATTISTACCI L.[2]

[1] Libero Professionista; [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia

Parole chiave: suino, ulcera gastrica, benessere, PCV2, PRRSV
Key words: pig, gastric ulcer, welfare, PCV2, PRRSV

Riassunto. L'ulcerazione della porzione esofagea dello stomaco costituisce un importante fattore di perdita economica nell'allevamento del suino e materia di studio nell'ottica del benessere animale. Il danno più evidente è rappresentato dalla mortalità relativa alla presenza di tale lesione unitamente al peggioramento delle performance produttive. L'eziologia polifattoriale ha stimolato ad investigare ipotesi più disparate. In questo lavoro si è inteso valutare la contemporanea presenza del Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV) e del Porcine Circovirus 2 (PCV2) quale elemento di rischio nel determinismo dell'ulcera gastrica.

Summary. Gastroesophageal ulcer in pigs represents an important factor of economic losses in pig breeding. It is also an actual matter of study for the Animal Welfare looking to the E.C legislation.
The main economic damage is related to the high level of mortality as well as the reduced productive performances. Its multifactorial aetiology stimulated researchers to investigate different hypothesis. Aim of this work was to evaluated the both presence of Porcine Reproductive Respiratory Syndrome virus and Porcine Circovirus 2, in the same animal, as possible risk factor in the gastroesophageal ulcer aetiology.

INTRODUZIONE

L'ulcera gastrica o più precisamente l'ulcerazione della porzione non ghiandolare, esofagea dello stomaco rappresenta una delle cause di mortalità più frequentemente registrate fra i suini in accrescimento. La fase di crescita "più critica" è quella del magronaggio-ingrasso dove, in relazione a dinamiche di allevamento, nutrizionali, stagionali e/o sanitarie, si possono verificare elevate percentuali di mortalità per questa problematica.
Anche i soggetti adulti, in particolar modo le scrofe in lattazione o nell'ultimo trimestre di gravidanza possono venire a morte a causa di tale lesione.

Nonostante siano stati effettuati interessanti lavori che hanno messo in evidenza l'importanza di certi fattori di rischio e/o di criticità (4, 7), non si è ancora compreso abbastanza sulle cause e sulle dinamiche di insorgenza dell'ulcerazione della pars oesophagea dello stomaco. L'avvento sul mercato di genetiche suine contraddistinte da una elevata potenzialità di accrescimento, di deposito in carne magra, unitamente ad una marcata riduzione dello spessore del grasso di copertura, ha fatto si che all'interno degli allevamenti di suini, vi sia una popolazione animale molto più "delicata" rispetto ad un recente passato, più sensibile quindi a dinamiche stressanti e quindi più difficile da gestire e da soddisfare nelle proprie esigenze nutrizionali ed ambientali. A tutto ciò va aggiunta la presenza, in alcuni casi contemporanea, di patogeni da considerare "non più emergenti" (PRRSV e PCV2) che vanno a complicare una situazione già "difficile".

Il significativo aumento delle mortalità e delle lesioni rilevate in sede di macellazione, registrato nell'ultimo decennio e riconducibile alla presenza di ulcera gastrica, potrebbe esserne la naturale manifestazione.

E' ormai universalmente condiviso che l'ulcerazione della porzione esofagea dello stomaco riconosce una eziologia multifattoriale.

Fra i numerosissimi fattori di "rischio" dobbiamo considerare quelli di natura:

a) nutrizionale (9, 15):
   a. diete a basso tenore di fibra e proteine
   b. livelli energetici elevati
   c. carenze di Selenio e Vitamina E
   d. diete con elevato tenore di Ferro, Rame o Calcio
   e. bassi livelli di Zinco
   f. elevate inclusioni di acidi grassi polinsaturi
   g. diete basate molto sulla presenza di siero di latte o latte scremato
   h. dimensioni delle particelle di alimento dopo la macinatura (più sono piccole più elevata è la potenzialità ulcero genetica);
b) manageriale (6):
   a. alimentazione ad intervalli irregolari e insufficiente spazio/capo/mangiatoia
   b. periodi di digiuno e/o dimagramento
   c. sovraffollamento e rimescolamento delle baste
   d. trasporto
   e. insufficiente apporto alimentare e soprattutto di acqua;
   f. sensibili oscillazioni della temperatura ambientale, nell'arco della giornata
   g. mancanza di adeguato comfort nelle strutture di allevamento
   h. stress da "contatto con l'uomo"
   i. razza. L'ereditabilità dell'ulcera gastrica ha, infatti, un coefficiente stimato di circa 0,52
c) sanitaria:
   a. sembra esistere una chiara e diretta correlazione fra il rilevamento dell'ulcera gastrica e certi episodi di sindrome respiratoria (6)
   b. l'ulcera può essere consequenziale anche a patologie setticemiche (3, 14) o alla presenza di batteri spiraliformi (GLO) - *Helicobacter pylori*-like bacteria (2, 10, 12)

Alla luce di quanto premesso, si è voluto, in questo lavoro, verificare la presenza di ulcerazione della pars oesophagea dello stomaco, in suini all'ingrasso, venuti a morte in allevamenti del Centro Italia, sicuramente positivi sia per PRRSV che per PCV2 e, al contempo, mettere in relazione l'incidenza di tale lesione con lo stato immunitario naturale dell'allevamento di appartenenza.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2007 sono stati identificati 16 allevamenti di suini, con positività sierologica e virologica nei confronti di PRRSV e PCV2. Si è provveduto quindi ad effettuare, con criterio di pura casualità, l'esame anatomopatologico di n.° 5 (cinque) soggetti all'ingrasso, venuti a morte, in epoche diverse, in ciascun allevamento.
Dagli organi di questi animali sono state effettuate delle indagini virologiche attraverso la metodica PCR (Polimerase Chain Reaction) per PRRSV e PCV2. In dettaglio, per ciò che concerne l'indagine relativa a PRRSV sono stati utilizzati campioni di polmone, mentre per l'indagine nei confronti di PCV2 sono stati utilizzati pool di tre organi per ogni suino (linfonodi inguinali, tonsille e polmone).
Contemporaneamente, nel corso dell'anno, è stato effettuato un monitoraggio sierologico, all'interno di ciascun allevamento di provenienza di questi suini, al fine di valutare lo stato di "benessere" degli animali, attraverso la determinazione di alcuni parametri di immunità aspecifica e stress ossidativo.
Questo monitoraggio ha comportato il salasso di n.° 30 suini per allevamento, scelti a "random", nello stesso reparto di provenienza dei soggetti sottoposti ad esame anatomo-patologico. Tutti i prelievi sono stati effettuati alla giugulare, al mattino prima della somministrazione degli alimenti e recapitati immediatamente refrigerati in laboratorio. I sieri ottenuti previa centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti a 4°C sono stati aliquotati e posti a –20°C fino al momento dell'uso. Con il siero di questi animali sono state eseguite prove per valutare lo stato del sistema immunitario aspecifico (titolazione del lisozima sierico (11), determinazione delle battericidia sierica (5), titolazione semiquantitativa del complemento sierico (1)) e lo stress ossidativo (ROM's e PAO).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella Tabella 1 sono riassunti i dati relativi alla tipologia dell'allevamento di provenienza, alle positività virologica nei confronti di PRRSV e PCV2 e alla presenza di ulcera gastrica nei suini controllati.
Nella colonna 6 è stato riportato il numero di animali positivi per entrambi i patogeni e nella colonna 7 il numero di questi soggetti che presentavano l'ulcerazione della porzione esofagea dello stomaco (Figura 1 e Figura 2).

Tab. 1. Risultati positività virologica (PCR) per PRRSV e PCV2 più presenza di ulcera gastrica
Tab. 1. *PRRSV and PCV2 virological positivity and gastric ulcer presence: results*

N. All	Tipologia Allevamento	PRRSV Pos/Tot	PCV2 Pos/Tot	Presenza di Ulcera gastrica Pos/Tot	PRRSV + PCV2 Pos/Tot	Presenza di Ulcera gastrica Pos/Tot
1	Ingrasso a ciclo continuo – provenienza multipla, solo nazionale	3/5	4/5	3/5	3	3/3
2	Ingrasso a ciclo continuo – unica scrofaia di provenienza	5/5	5/5	5/5	5	5/5
3	Ingrasso a ciclo continuo – unica scrofaia di provenienza	3/5	4/5	3/5	3	3/3
4	Ingrasso a ciclo continuo provenienza multipla, anche estera	5/5	5/5	4/5	5	4/5
5	Ingrasso di scrofaia c.c.	2/5	5/5	5/5	2	2/2
6	Ingrasso di scrofaia c.c.	5/5	5/5	3/5	3	3/3
7	Ingrasso a ciclo continuo provenienza multipla, anche estera	5/5	5/5	4/5	5	4/5
8	Ingrasso di scrofaia c.c.	5/5	5/5	5/5	5	5/5
9	Ingrasso sito 3 (ciclo continuo)	3/5	5/5	5/5	3	3/3
10	Ingrasso a ciclo continuo (tutto pieno/tutto vuoto per capannone)	5/5	5/5	3/5	5	3/5
11	Ingrasso sito 3 (tutto pieno/tutto vuoto per settore)	5/5	5/5	1/5	5	1/5
12	Ingrasso di scrofaia c. c.	4/5	5/5	3/5	4	3/4
13	Ingrasso di scrofaia c.c.	5/5	5/5	5/5	5	5/5
14	* Ingrasso sito 3 (tutto pieno/tutto vuoto per settore)	5/5	5/5	0/5	5	0/5
15	Ingrasso a ciclo continuo provenienza multipla, anche estera	5/5	5/5	4/5	5	4/5
16	Sito 2 (lattoni di 10 – 11 sett.)	0/5	3/5	0/5	0	0
	TOTALI	65/80	76/80	53/80	63	48/63
	%	81,25	95,00	66,25		76,2

* i soggetti controllati in questo allevamento, sono venuti a morte nella stessa mattinata. È stato così possibile effettuare un monitoraggio sierologico e virologico dai loro compagni di box. I campioni di sangue prelevati (n.° 20 soggetti) sono risultati tutti positivi per PRRSV e PCV2 secondo la metodica PCR (5 pool da 4 sieri ciascuno), mentre il controllo sierologico per PRRSV effettuato con metodica ELISA, su ogni soggetto, ha dato riscontro negativo per 17 animali su 20.

Fig. 1. Ulcera gastrica
Fig. 1. *Gastric ulcer*

Fig. 2. Ulcera gastrica (vicino al cardias)
Fig. 2. *Gastric ulcer (cardia area)*

Risulta chiaramente come l'ulcera gastrica della porzione esofagea dello stomaco rappresenti un reperto anatomopatologico di frequente riscontro nei suini all'ingrasso. Essa costituisce concausa e/o a volte causa determinante della morte dell'animale.
Dalla indagine effettuata nei 16 allevamenti controllati la positività virologica nei confronti di PRRSV è stata riscontrata in 65 animali sugli 80 sottoposti ad esame anatomopatologico, pari al 81,25%, mentre quella relativa a PCV2 è stata evidenziata in 76 soggetti su 80, pari al 95%. La presenza di ulcera gastrica della porzione esofagea dello stomaco è stata rilevata in 53 suini sugli 80 controllati, pari al 66,25%.
Nella tabella 2 sono riassunti i risultati del monitoraggio sierologico relativo ai valori di alcuni parametri di immunità aspecifica (battericidia, complemento, lisozima) e allo stress ossidativo (ROMs e PAO) rilevati in suini, apparentemente sani, presenti negli stessi reparti di ingrasso dai quali provenivano gli animali sottoposti ad esame anatomopatologico.
Si può evidenziare come in tutti gli allevamenti presi in esame ci sia una compromissione del sistema immunitario aspecifico e un' alterazione dei valori relativi allo stress ossidativo e al potere antiossidante.
In particolare i bassi valori di attività battericidica del siero e di complemento emolitico sono indicativi di un coinvolgimento del sistema immunitario e di una conseguente immunodepressione; d'altro canto gli alti valori di lisozima indicano la presenza di processi infiammatori in atto.
I Metaboliti Reattivi all'Ossigeno (ROMs) sono normalmente presenti nel siero ma in concentrazioni inferiori a quelle trovate e controbilanciati da una adeguata presenza di sostanze con Potere Antiossidante (PAO). Un aumento dei ROMs può essere riconducibile a vari fattori legati sia alle razze allevate che a processi infiammatori in corso. Infatti nelle razze suine ibrido commerciali c'è una più alta espressione dell'ormone della crescita rispetto alle razze rustiche con conseguente aumento del metabolismo ossidativo. In questi animali si ha un apporto insufficiente di ossigeno ai tessuti mediante il sistema cardiocircolatorio.

Tab. 2. Riepilogo risultati monitoraggio per Immunità aspecifica
Tab. 2. *Innate immune parameters monitoring: results*

Allevamento	Battericidia >40%	Lisozima <1 - >3 µg/ml	Complemento >80 Ch50	ROMs 25.6±1 mmol H2O2	PAO 471±13 µM HCLO neutralizzate
1	34,17	8,98	42,02	47,75	266,8
2	8,60	9,29	88,94	44,63	266,32
3	39,80	4,58	79,78	61,28	200,24
4	12,57	7,86	74,94	49,26	213,04
5	23,79	8,39	81,50	53,07	277,39
6	11,18	4,25	78,47	44,16	91,79
7	25,00	3,02	52,23	38,86	195,52
8	33,14	4,20	97,67	41,92	230,72
9	38,22	9,92	84,86	44,65	242,19
10	20,82	3,25	74,75	51,44	232,67
11	33,39	6,35	66,22	44,53	207,52
12	6,46	4,52	65,10	53,58	276,66
13	26,51	2,53	81,11	54,4	267,96
14	29,03	1,66	57,07	54,17	271,71
15	40,19	1,45	76,00	60,37	267,28
16	39,09	3,47	58,13	57,98	339,17

La presenza di fenomeni infiammatori, inoltre, provoca un aumentato rilascio dei Sostanze Reattive all'Ossigeno da parte dei leucociti.
L'evidente "alterazione" del sistema immunitario innato potrebbe, a nostro avviso, essere legato ad uno stato di stress cronico sostenuto sia dai patogeni presenti sia da dinamiche ambientali. Tali alterazioni sono oggetto di ulteriori approfondimenti al fine di valutarne la validità prognostica e renderli utilizzabili quali attendibile strumento di prevenzione.
La nostra indagine ha voluto principalmente approfondire un aspetto importante relativo alla eziologia dell'ulcera. Abbiamo valutato infatti come la contemporanea positività virologica sia per PRRSV che per PCV2 potesse costituire un ulteriore fattore di rischio (8) per l'insorgenza di tale lesione.
Nella colonna 6 della tabella 1 sono riassunti gli animali (n.° 63) positivi virologicamente per entrambi i virus, in ciascuno degli allevamenti testati. Nella adiacente colonna 7 sono riportati i soggetti con ulcera gastrica, risultati inoltre positivi per ambedue i virus.
In 48 suini su 63, (76,2%) è stata rilevata ulcera gastrica nella porzione esofagea dello stomaco in grado variabile.
L'analisi statistica effettuata attraverso la determinazione del χ^2 (chi – quadrato), mettendo a confronto la percentuale di soggetti con ulcera gastrica sul totale dei controllati e quella relativa alla presenza di ulcera sul totale dei soggetti positivi ad entrambi i virus, è risultata in un P = 99%.
Questo valore, espressione di una elevatissima significatività, ci fa avanzare una ragionevole ipotesi, secondo la quale la presenza contemporanea dell'Arterivirus (PRRSV) e del Circovirus (PCV2) possa costituire un importantissimo elemento di criticità, quindi di rischio, per ciò che concerne l'insorgenza dell'ulcera della porzione esofagea

dello stomaco. Tutto ciò, ancor più esacerbato, dalla "precarietà" dello stato immunitario naturale "di allevamento".
I risultati da noi ottenuti indicano percentuali di presenza di ulcera gastrica nettamente superiori a quelli riportati in altri lavori (13), dove era stata valutata la presenza di ulcera gastrica della porzione esofagea (28.5%) in soggetti affetti solo da circovirosi suina.
Da segnalare la presenza di duplice positività (PRRSV + PCV2) negli animali sottoposti ad esame anatomopatologico nell'allevamento 14, in assenza di ulcera gastrica. Come riportato in una precedente nota (vedi * tabella 1) sono stati effettuati dei controlli sierologici e virologici, nel siero di sangue di suini vivi dello stesso box di appartenenza di quelli sottoposti ad esame necroscopico. La contemporanea negatività sierologica riscontrata per PRRSV, saggiata con Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories), unitamente alla positività virologica ottenuta alla P.C.R (Polymerase Chain Reaction) con metodica propria dell'IZSUM, ci ha fatto avanzare l'ipotesi che i soggetti venuti a morte erano ancora nella fase viremica iniziale della malattia e quindi troppo precoce, in termini di tempo, per lo sviluppo dell'eventuale ulcerazione della porzione esofagea dello stomaco.

CONCLUSIONI

L' ulcerazione della porzione esofagea dello stomaco riconosce, senz'ombra di dubbio, un'origine polifattoriale, che stimola la fantasia del ricercatore nell' andare a verificare ipotesi o sospetti quanto mai disparati.
Situazioni di stress cronico sembrano avere importanza tangibile nel determinismo di questa lesione gastrica. Numerosissimi sono i fattori chiamati in causa e alla luce dei risultati ottenuti con il nostro lavoro, si può ragionevolmente avanzare l'ipotesi che la contemporanea presenza del virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del suino (PRRSV) e del Circovirus 2 del suino (PCV2) costituiscano un importante fattore di criticità per lo sviluppo dell'ulcera.
Al contempo, riteniamo che la determinazione di alcuni parametri dell'immunità aspecifica, e dello stress ossidativo possano rappresentare dei validi strumenti per la valutazione del benessere degli animali all'interno dell'allevamento e quindi del loro stato di adattamento all'ambiente. Ogni alterazione di questo stato potrebbe verosimilmente essere ricondotta a stressors, che per loro definizione sono, in generale, predisponenti all'ulcera gastrica della porzione esofagea dello stomaco.

BIBLIOGRAFIA

Barta V., Barta O. (1993) Testing of Hemolitic Complement and its components. In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA.

Cantet F., et al. (1999) Helicobacter Species Colonizing Pig Stomach: Molecular Characterization and Determination of Prevalence. Applied And Environmental Microbiology Oct. 1999, p 4672-4676

Choi C., Chae C. (2001) Colocalization of Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2 in Porcine Dermatitis and Nephropaty Syndrome by Double-Labeling Technique. Vet. Pathol. **38**:436-441

Deen J. (2000) Epidemiology of gastroesophageal ulcers. Allen D Leman Swine Conference, St. Paul, Minnesota, 2000, p 96

Dorn W., Mehl G., Clem CHR, (1980) Untersuchungen zur serumbakterizidie beim Kalb. Arch. Exper. Vet. Med. 34, 635- 650

Friendship R.M. (2003) Gastric Ulcers: An Under-Recognized Cause of Mortality and Morbidity. Advances in Pork Production Vol. 14 pg 159

Friendship R.M. (2004) Gastric ulceration in swine J.Swine Health Prod. **12**:34-35

Harms P.A., et al. (2001) Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine reproductive and respiratory Syndrome Virus

Kopinski J., McIntosh B. (2005) Gastric ulcers in pigs. DPI&F's web site at www.dpi.qld.gov.au/pigs/

Krakowka S., Ellis J., (2006) Reproduction of Severe gastroesophageal Ulcers (GEU) in Gnotobiotic Swine Infected with Porcine *Helicobacter pylori*-like Bacteria. Vet. Pathol. **43**:956-962

Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966) Serum and urinary lisozime (muramidase) in monocytic and monomyelociticleukemia. J. Exp. Med. 124, 921- 952.

Roosendaal R., et al. (2000) Slaugther Pigs Are Commonly Infected by Closely Related but Distinct Gastric Ulcerative Lesion-Inducing Gastrospirilla. J. Of Clinical Microbiology July 2000, p. 2661-2664

Segalés J., et al. (2004) Suis (10): 14-23

Straw B., et al. (1992) Prevalence of lesions in the pars oesophagea of normal and sick pigs. Proc Int Pig Vet Soc Cong. The Hague,1992, p 386

Wondra K.J., et al (1995) Effect of particle size and pelleting on growth performance, nutrient, digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. J. Anim. Sci. 1995; 73:757

VALUTAZIONE DI UNA STRATEGIA DI ACCLIMATAMENTO NEI CONFRONTI DELLA PRRS SU ALCUNI PARAMETRI RIPRODUTTIVI IN SCROFE AL PRIMO PARTO

EVALUATION OF A ACCLIMATIZATION POLICY TO CONTROL PRRS ON SOME REPRODUCTIVE PARAMETERS IN PRIMIPAROUS SOWS

DRIGO MICHELE[1], BORTOLETTO GIACOMO[1], DEMATEO-AZNAR MARIA[2], PERSONA ANDREA[3] MARTINI MARCO[1]

[1] Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova; [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Sede di Legnaro; [3]Veterinario Libero Professionista

Parole chiave: PRRS, acclimatamento, controllo, performances.
Key words: PRRS, acclimatization, control, performances.

Riassunto. Scopo di questo lavoro é quello di valutare l'efficacia e i punti critici di una strategia di controllo della PRRS basata sull'acclimatamento delle scrofette da rimonta in una azienda suinicola da riproduzione. Sono stati pertanto monitorati sierologicamente e virologicamente 10 gruppi di scrofette (per un totale di 507 campioni) al momento della loro entrata in produzione nel periodo compreso tra aprile 2006 e luglio 2007. Alcuni parametri riproduttivi delle scrofe giunte al primo parto, quali nati totali, nati vivi, nati morti e mummificati, sono stati raccolti e analizzati in relazione dell'immunità di gruppo, intesa come prevalenza anticorpale di gruppo, come positività/negatività individuale e come media degli s/p ratio. I risultati dimostrano come sul numero di nati vivi vi sia un effetto della stagione (il loro numero è significativamente più basso nel periodo aprile-luglio 2007). Lo stato sierologico al momento dell'entrata in produzione delle scrofette invece non è risultato significativamente associato alle performances riproduttive.

Abstract. The aim of this study is to evaluate the efficiency and the critical points of a control strategy for PRRS in a breeding herd based on the acclimatization of gilts. We collected samples for virological and serological testing from 10 groups of gilts at the end of the acclimatization in the period between April 2006 and July 2007. Some reproductive parameters of the first farrow sows (number of total born piglet, number of born alive piglets, number of born dead piglets and number of mummified piglets) were recorded and relate to immunity expressed as group antibodies prevalence, as individual immunological status (seropositive vs seronegative) and as group mean s/p ratio. The results show a season effect on the number of born alive piglets (their number is significantly lower in the period April 2007 – July 2007). Serological status does not result significantly associated with reproductive performances.

Introduzione

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è una delle virosi di maggior impatto economico per la zootecnica suinicola in tutto il mondo (Edwards et al. 1992; Le Potier et al. 1997; Zimmermann et al. 1997; Weigel et al. 2000) La grande variabilità nella biologia di questo virus e nella sua epidemiologia (Blaha 2000) e l'assenza di efficaci strumenti di profilassi indiretta inducono allevatori e veterinari a mettere a punto adeguate strategie di controllo mirate a convivere con l'infezione e a ridurre i danni da essa provocati (Dee e Joo, 1997; Zimmermann 2006). L'agente eziologico responsabile di questa infezione (PRRSv) appartiene alla famiglia degli Arteriviridae (Meuleberge 2000) ed è responsabile di una patologia caratterizzata da disordini riproduttivi, soprattutto durante l'ultima fase della gestazione, perdite perinatali e sintomi respiratori nei suinetti (Van Reeth 1997; Prieto et al. 2000). In questo contesto si inserisce questo studio, volto a valutare l'efficacia e i punti critici di una strategia di controllo della PRRS basata sull'acclimatamento delle scrofette da rimonta in una azienda suinicola da riproduzione. Questo sistema dovrebbe consentire l'entrata in produzione di scrofe immuni verso gli stipiti di PRRSv circolanti in azienda, contrastando gli effetti dell'infezione in animali gravidi e garantendo una efficiente trasmissione di immunità passiva ai suinetti.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un allevamento di suini da riproduzione, situato in Veneto, che dalla metà degli anni '90 è infetto da PRRS. Tale azienda conta circa 1570 scrofe in produzione ed ha come obbiettivo commerciale la vendita di magroni di 25-30 kg ed è caratterizzato da elevati standard di biosicurezza. La rimonta viene effettuata acquistando 52 animali ogni mese, di 6 kg e 3-4 settimane d'età provenienti da un centro certificato PRRS-free. L'acclimatamento inizia con l'immissione delle scrofette nel reparto svezzamento in box intervallati a box di lattoni autoctoni e coetanei. Dopo circa un mese sia le scrofette che i lattoni vengono posti nel reparto magronaggio, intervallando i box. Dopo un mese ulteriore le scrofette proseguono l'acclimatamento nel reparto accrescimento per tre mesi dove vengono utilizzati gruppi di 12 lattoni di 6-8 settimane, come possibili diffusori di virus, sostituiti ogni due settimane.
I prelievi sono stati effettuati in 10 gruppi di 52 scrofette a fine acclimatamento per un totale di 507 campioni, prelevati tra aprile e giugno 2006 i gruppi 1, 2, 3, tra ottobre 2006 e dicembre 2006 i gruppi 4, 5, 6 e tra aprile e luglio 2007 i gruppi 7, 8, 9, 10 per valutare la strategia di acclimatamento.
Le scrofe che è stato possibile seguire al primo parto sono state 447.

TEST DIAGNOSTICI
Il test ELISA (Se 97,4% - Sp 99,6%) e la RT-PCR (Se 90% - Sp 100%) (Persia et al. 2001) sono stati i metodi diagnostici usati per la quantificazione degli anticorpi anti-PRRSv e l'isolamento dell'RNA virale sia del ceppo europeo che di quello americano. La ricerca virale è stata effettuata in pool da 5 campioni.

ANALISI STATISTICA DEI DATI

I parametri riproduttivi (numero di nati, nati vivi, nati morti e mummificati) e il valore medio di s/p ratio sono stati confrontati tramite ANOVA e test di Mann-Whitney.

Il test del χ^2 è stato impiegato per confrontare i parametri nati morti e mummificati codificati come presenza assenza dell'evento. Un valore di $p<0.05$ è stato considerato come soglia di significatività statistica.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS per Windows, Rel. 12.0.0. 2003 (SPSS Inc., Chicago – IL).

RISULTATI

I dati relativi al monitoraggio sierologico e virologico delle scrofette a fine acclimatamento sono rappresentati in figura 1.

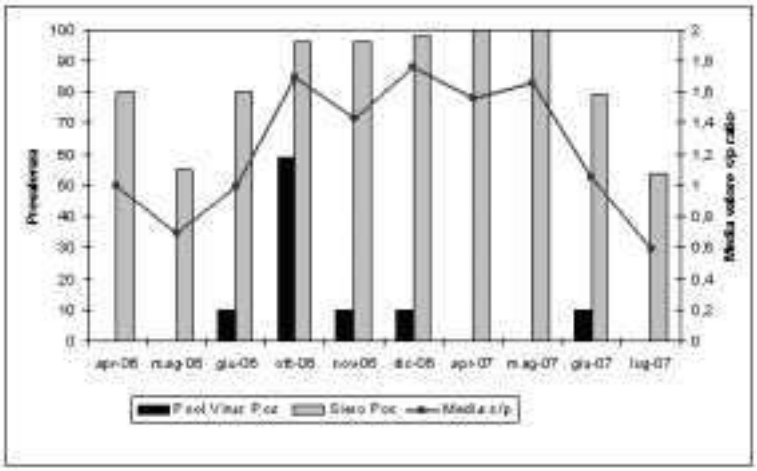


Fig.1. Dati sierologici e virologici dei 10 gruppi di scrofette a fine acclimatamento
Fig.1. *Serological and virological data of the 10 gilts groups at the end of acclimatization*

Inizialmente la strategia di acclimatamento ha dimostrato di funzionare in modo non adeguato per quanto riguarda l'obiettivo di raggiungere il maggior numero possibile di scrofe siero positive al momento della loro entrata in produzione, soprattutto per il secondo gruppo acclimatato in cui quasi la metà dei soggetti è risultato siero negative. Successivamente il percorso di acclimatamento ha permesso di raggiungere ottimali valori di sieroprevalenza di gruppo come si può notare nel periodo ottobre 2006 - maggio 2007. L'estate 2007 ha nuovamente dimostrato una flessione nei livelli di prevalenza anticorpale di gruppo raggiunti.

Code viremiche alla fine dell'acclimatamento sono possibili come riscontrato in 1 pool su 10/11 analizzati per gruppo nei periodi giugno, novembre e dicembre 2006 e giugno

2007; nel gruppo di ottobre 2006 la viremia riscontrata è stata più importante risultando positivi 6 pool su 11.
In figura 2 e 3 sono rappresentate le distribuzioni dei singoli valori di s/p ratio e del numero di nati vivi al primo parto rispettivamente, per gruppo di scrofette.

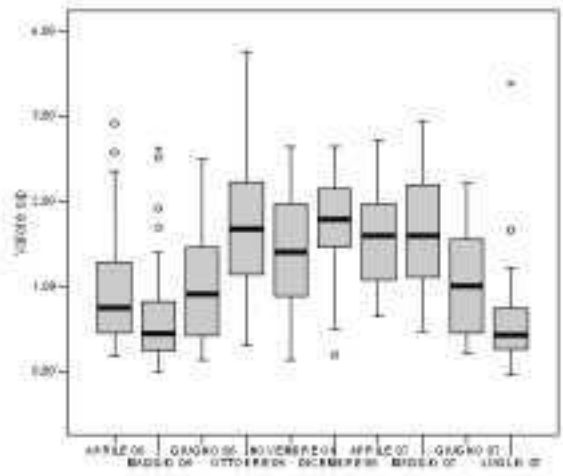


Fig. 2. Boxplots dei valori s/p ratio nei 10 gruppi di scrofette.
Fig. 2. *Boxplots of s/p ratio values in the 10 gilts groups.*

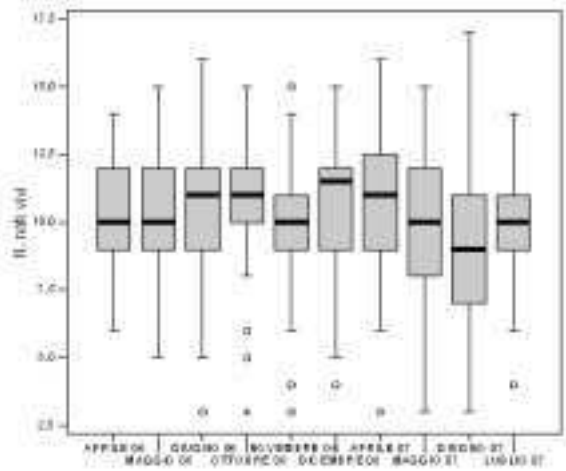


Fig. 3. Boxplots del numero di nati vivi per gruppo di scrofe al primo parto
Fig. 3. *Boxplots of the number of born alive piglets for 1st farrow sows group*

Dal confronto tra figura 2 e 3 si può intuire visivamente come il numero di nati vivi al primo parto risenta meno delle fluttuazioni temporali che invece si evidenziano nei

valori di s/p ratio di gruppo. In realtà sia il valore medio di s/p ratio (F=18,9, p<0.01) che il numero medio di nati vivi (F=2,3, p<0.05) sono risultati statisticamente significativi all'ANOVA effettuata sui 10 gruppi di scrofette presi singolarmente. Per indagare meglio queste relazioni si sono raggruppati i gruppi di scrofette in 3 stagioni di acclimatamento: aprile-giugno 2006, ottobre-dicembre 2006 e aprile-luglio 2007. In tabella 1 sono riportate le performance riproduttive e i valori di medi di s/p ratio per stagione di acclimatamento. In tabella 2 invece viene riportato il confronto tra il numero di nati vivi medio per categoria sierologica di scrofetta al momento dell'entrata in produzione.

Tab. 1. Performance riproduttive e valori medi di s/p ratio per stagione di acclimatamento
Tab. 1. *Reproductive performances and mean s/p ratio for acclimatization season*

Stagione	N	Nati totali			Nati vivi			Nati morti*	Mummificati*	Valore s/p	
		Totali	Media	Dev.St.	Totali	Media	Dev.St.			Media	Dev.St.
apr-giu06	133	1474	11,08	2,25	1400	10,53	2,26	27 (22)	47 (30)	0,90	0,68
ott-dic06	148	1601	10,82	2,54	1550	10,47	2,43	28 (23)	23 (21)	1,63	0,71
apr-lug07	166	1671	10,07	2,73	1635	9,85	2,70	20 (18)	16 (9)	1,20	0,75
Totale	447	4746	10,62	2,56	4585	10,26	2,50	75 (63)	86 (60)	1,25	0,77

*tra parentesi viene riportato il numero di eventi

Tab. 2. Numero di nati vivi medio per categoria sierologica a confronto
Tab. 2. *Mean born alive piglets compared for sierological category*

Siero	N	Media	Dev.St.
Negativo	67	10,19	2,572
Positivo	380	10,27	2,495
Totale	447	10,26	2,504

Le stagioni di acclimatamento considerate hanno dimostrato valori medi di s/p significativamente diversi tra loro (F=37,1, p<0.01 – Post Hoc Test: LSD); in particolare il periodo "invernale" (ottobre-dicembre 2006) è risultato associato ai valori medi di s/p ratio più elevati.
La stagione aprile–luglio 2007 è risultata significativamente associata a valori più bassi del numero medio di nati totali (F=6,61, p<0.01) e di nati vivi (F=3,56, p<0,05); nessuna differenza statisticamente significativa è stata invece riscontrata per questi due parametri nel confronto tra le stagioni aprile–giugno 2006 e ottobre–dicembre 2006. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per il numero di nati morti nemmeno quando analizzato come evento (presenza *vs* assenza). Le differenze osservate sul numero di feti mummificati invece sono risultate statisticamente significative in tutti i confronti operati tra le stagioni di acclimatamento (aprile-giugno 2006 *vs* ottobre-dicembre 2006; aprile-giugno 2006 *vs* aprile-luglio 2007; ottobre-dicembre 2006 *vs* aprile-luglio 2007) analizzato come dato quantitativo (Wilcoxon (Mann-Whitney) test z_1 = -2,003, p<0.05; z_2 =-4,297, p<0,01; z_3 = -2,52,p<0,05) che quando analizzato come evento (χ^2=18,77, p<0,01).

Per nessuno dei parametri riproduttivi considerati è risultata una differenza statisticamente significativa in funzione dello stato sierologico.

DISCUSSIONE

Nelle condizioni di endemia che attualmente sussistono anche nel territorio italiano non sembra realistico intraprendere la strada dell'eradicazione per un'azienda suinicola affetta da PRRS. Sono troppo elevati infatti i rischi di una reintroduzione del virus sia per via diretta che indiretta. Nel controllo della PRRS l'acclimatamento delle scrofette può essere quindi una buona strategia manageriale atta a convivere con i virus circolanti in azienda anche in considerazione della mancanza di strumenti di profilassi indiretta veramenete efficaci a causa della variabilità degli stipiti virali circolanti, della loro scarsa cross protezione e della variabilità nella risposta immunitaria evocata (Molitor et al. 1997; Zimmermann 2006).
L'acclimatamento delle scrofette, nell'azienda oggetto di questo lavoro è risultata generalmente efficace nel conferire una buona immunità di gruppo sia per prevalenza anticorpale che per titolo. Questo andamento ha dimostrato tuttavia alcuni momenti negativi nel raggiungimento di questo obiettivo, molto probabilmente in dipendenza della diversa circolazione virale tra i reparti svezzamento e magronaggio, (reparti chiave nel percorso di acclimatamento delle scrofette) come evidenziato da alcuni monitoraggi virologici effettuati.
Il livello di immunità presente non è risultato strettamente correlato al numero di nati vivi al primo parto. Tuttavia la strategia di acclimatamento va vista primariamente come strumento per il mantenimento della stabilità aziendale (Dee e Joo 1997), quindi del suo stato sanitario e delle performance ri/produttive, soprattutto quando associata a ottimali standard di biosicurezza.
Non sembra quindi sufficiente fermarsi a valutare i titoli anticorpali. Vanno considerati anche altri aspetti quantitativi come la prevalenza di gruppo e altri aspetti qualitativi qui non affrontati come il numero e il profilo antigenico e patogenetico degli stipiti virali circolanti, come ad es. riportato da Bonilauri et al. nel 2006.
Rimangono tuttora aperte domande cruciali riguardo alla relazione tra ceppo virale e manifestazione clinica, durata della viremia, capacità di indurre livelli anticorpali proteggenti duraturi e cross-proteggenti verso virus eterologhi (Meier et al. 2000), ma rimane fermo il principio che anche le migliori strategie di acclimatamento vanno accoppiate a buone misure di biosicurezza.

BIBLIOGRAFIA

Benfield D.A., Nelson J., Rossow K., Rowland R.R., Lawson S.R., Steffen M., Collins M. (1998). *Pathogenesis and persistence of PRRS*, in: Proceedings Leman Conference, 169-186.
Blaha T. (2000). *The "colorful" epidemiology of PRRS*, Vet. Res. 31, 77-83.
Dee S.A., Joo H.S. (1997). *Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences*, Vet. Microbiol. 55, 347-353.

Drew T.W. (2000). *A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, Vet. Res. 31, 27-39.
Edwards S., Robertson I.B., Wilesmith J.W. (1992). *PRRS blue-eared pig disease in Great Britain*, Am. Assoc. Swine Pract. News 4, 32-36.
Meier W., Wheeler J., Husmann R.J., Osorio F., Zuckermann F.A. (2000). *Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus*, Vet. Res. 31, 41.
Meulenberg J.J.M. (2000). *PRRSV, the virus*, Vet. Res. 31, 11-21.
Molitor T.W., Bautista E.M., Choi C.S. (1997). *Immunity to PRRSV: Double-edged sword*, Vet. Microbiol. 55, 265-276.
Nelsen C.J., Murtaugh M.P., Faaberg K.S. (1999). *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution of two continents*, J. Virol. 73, 270-280.
Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001). *Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples*, International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology.
Prieto C., Castro J.M. (2000). *Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows*, Vet. Res. 31, 56-57.
Software SPSS per Windows, Rel. 12.0.0. 2003 (SPSS Inc., Chicago – IL).
Van Reeth K. (1997). *Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*, Vet. Microbiol. 55, 223-230.
Weigel R.M., Firkins L.D., Scherba G. (2000). *Prevalence and risk factors for infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in swine herds in Illinois (USA)*, Vet. Res. 31, 87-88.
Zimmerman J.J., Yoon K.-J., Wills R.W., Swenson S.L. (1997). *General overview of PRRSV: A perspective from the United States*, Vet. Microbiol. 55, 187-196.
Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M. (2006). *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)*, in: Diseases of swine 9th edition, Blackwell Publishing, 387-417.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DIVERSI STIPITI DI CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) ISOLATI NEL CINGHIALE NEL CENTRO ITALIA

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) IN WILD BOARS IN CENTRAL ITALY

PETRINI S.[1], GAVAUDAN S.[2], BAROCCI S.[1], BRISCOLINI S.[1], SEBASTIANI C.[3], MANCINI P.[3], PANICCIÀ M.[1], VILLA R.[4], FERRARI M.[4]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione diagnostica di Fermo (AP); [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione diagnostica di Pesaro (PU); [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, sede di Perugia (PG); [4] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Brescia (BS)

Parole chiave : PCV2, cinghiali, isolamento, caratterizzazione molecolare.
Key words: PCV2, wild boars, isolation, molecular characterization.

Riassunto. Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è stato identificato nel suino domestico da diversi anni. Molti studi indicano che PCV2 infetta i suidi domestici e poche informazioni sono rivolte alla stessa infezione nei suidi selvatici cacciati. Nel presente lavoro sono riportate le ricerche condotte (Esami anatomo-istopatologici, virologici, biomolecolari e di sequenziamento genomico) su cinghiali cacciati nella Regione Marche nell'anno 2006. Dopo aver evidenziato le classiche lesione anatomo-istopatologiche da PCV2 ed aver isolato diversi stipiti di circovirus suino tipo2, il sequenziamento genomico ha evidenziato il 95-97% di omologia della regione ORF2 con stipiti di referenza presenti in banca dati (GenBank).

Abstract. Porcine circovirus type 2 (PCV2) was first identified in domestic swine. Most studies have indicated that PCV2 infects only swine but there is little information on porcids other than improved breeds of domestic swine. We show that PCV2 was identified in wild boars by gross and/or histological examinations, isolation, PCR and Real-Time PCR. The ORF2 of the isolated PCV2 had 95-97% homology with ORF2 of reference PCV2 isolates. These diagnostic data suggest that PCV2 can infect and cause disease in *Sus scrofa* subspecies other than swine.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è responsabile di ingenti danni economici nell'allevamento del suino in tutto il mondo. Il virus appartiene alla Famiglia Circoviridae, genere *Circovirus* ed è caratterizzato da un genoma a DNA circolare, monocatenario di 18 kb. Il genoma è composto da 6 ORF, di cui 2 rivestono un importanza maggiore: ORF1

che codifica per proteine associate alla replicazione virale e ORF2 che codifica per proteine strutturali capsidiche (4). Studi condotti da Nawagitgul *et al.* (2000) hanno dimostrato che ORF2 è il responsabile della variabilità antigenica del virus e rappresenta uno dei fattori associati alla difficoltà di controllo di tale patologia. Clinicamente l'infezione nel suino, è associata ad una malattia debilitante denominata sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS) descritta per la prima volta in Canada (1) e successivamente in altri Paesi. Le manifestazioni patologiche sono riconducibili a forme respiratorie, riproduttive, enteriche e di deperimento post-svezzamento. Negli allevamenti colpiti il virus è difficilmente eradicabile in ragione della sua persistenza in soggetti infetti per periodi prolungati ed in conseguenza alla trasmissione dell'infezione ad altri suini sensibili. Uno dei fattori responsabili della persistenza del virus nell'organismo è da attribuirsi alla variabilità genetica che si verifica durante la replicazione virale nell'ospite con implicazioni antigeniche, di virulenza e di immunogenicità.
Ad oggi gli studi condotti su questo agente infettivo, si riferiscono in gran parte alla infezione da PCV2 in suidi domestici, mentre sono scarse le informazioni riguardanti la capacità di questo virus di infettare i suidi selvatici.
Scopo del presente lavoro è stato quello descrivere le lesioni anatomo-istopatologiche associate all'isolamento e la caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di PCV2 rilevati in cinghiali cacciati nella Regione Marche nell'anno 2006.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti ad esami 48 campioni d'organo, costituiti da linfonodi tracheobronchiali, polmoni e tonsille palatine, provenienti da 16 cinghiali abbattuti nella Regione Marche. I campioni sopramenzionati, sono stati utilizzati per indagini anatomo-istopatologiche, virologiche, biomolecolari, (PCR, Real-Time PCR) e di sequenziamento per i genomi virali rilevati.

Esami anatomo-istopatologici
Su tutti i soggetti abbattuti sono stati condotti esami necroscopici. I campioni d'organo (linfonodi tracheo-bronchiali, polmoni, tonsille palatine) sono stati raccolti durante gli esami necroscopici e fissati in soluzione di formalina tamponata al 10%, pH 7.4 (soluzione acquosa di formaldeide al 40-50%). Dai campioni fissati, processati e inclusi in paraffina sono state ottenute sezioni dello spessore di 5 µm, colorate successivamente con Ematossilina-Eosina (E-E).

Isolamento Virale
I campioni sono stati omogeneizzati per 5 minuti in 15 ml di terreno minimo essenziale (MEM), e aggiunti di antibiotici per 4 ore a temperatura ambiente (22°C). Successivamente sono stati centrifugati a 850 x *g* per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato inoculato su piastre Costar® 24 (Corning, USA) contenenti colture cellulari di rene neonatale suino (NSK), clone BS CL 177 (Ferrari *et al.* 2003), utilizzando tre pozzetti per ciascun campione. Le piastre sono state poi incubate a 37°C in presenza di 5%

CO_2. Le stesse sono state controllate giornalmente e a distanza di 7 giorni l'uno dall'altro, sono stati effettuati 3 passaggi seriali. Al fine di rilevare la presenza virale, è stata eseguita la prova di Real-Time PCR.

PCR

L'estrazione di DNA genomico è stata eseguita con Kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Italia) da omogenati (1:5 in PBS) di pool di organi. La PCR è stata effettuata secondo il protocollo di Ellis *et al.* (1999) in un volume di 25 µL contenente $MgCl_2$ (1 mM), Buffer GoTaq® 1X (Promega, WI, USA), dNTPs (0,2 mM), primers PMWS-150 e PMWS-1443 (1 µM), GoTaq® (1,25 U) e 2,5 µL di DNA. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C x 1'; 35 cicli a 94°C x 1', 55°C x 1', 72°C x 1'; estensione finale a 72°C x 10'. Gli ampliconi ottenuti sono risultati di 481 bp. La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio al 2%. Per la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il bromuro di etidio (Sigma-Aldrich, Italia) e, come marker di peso molecolare, è stato utilizzato il Ladder 100 bp (Celbio, Italia).

Real-Time PCR

Il DNA virale è stato estratto da 200 µl di surnatante di colture cellulari (NSK) utilizzate per l'isolamento virale. Il protocollo utilizzato è stato quello descritto dalla QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Italia). Per l'amplificazione sono stati utilizzati primers da sequenze conservate di ORF2 (6). La reazione è stata effettuata in un volume di 20 µl contenente: 1X Master Mix (Eppendorf, Italia), 200 nM forward primer (5'-TAGGTGAGGGCTGTGGCCTTT-3'), 200 nM reverse primer (5'-ATGGCATCTTCAACACCCGCC-3'), 100 nM TaqMan probe (5'-ATCTCATCATGTCCACCGCCCAGGA-BHQ1-3'). Dopo aver aggiunto 5 µl di DNA template, gli ampliconi sono stati amplificati in Real-Time PCR System DNA Engine Opticon 2 (Biorad, Italia) usando i seguenti parametri: iniziale attivazione della polimerasi a 95°C per 1 minuto seguito da 35 cicli a 94°C per 20 secondi e un ulteriore ciclo a 60°C per 1 minuto. Il numero dei cicli richiesti per determinare la fluorescenza (C_t) è stato determinato per ogni campione.

Sequenziamento genomico

Per quanto concerne l'amplificazione dell'ORF2 è stato applicato il protocollo di Ellis *et al*., (2003). I prodotti da 995 bp della PCR per l'ORF2, dopo controllo su gel di agarosio al 2%, sono stati purificati (High pure PCR product purification kit, Roche) e sequenziati (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) con capillare ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati ottenuti sono stati elaborati con l'utilizzo del software Sequencing® Analysis v5.2.

RISULTATI

Tutti gli animali sottoposti ad esami necroscopici presentavano condizioni organiche scadenti, associate ad atrofia muscolare. Si riscontravano lesioni polmonari in 4 sog-

getti con evidenza di polmoniti apicali associate a emorragie. Il parenchima polmonare in parte distrutto mostrava fragilità e al taglio presentava zone emorragiche. In alcuni casi il tessuto polmonare era caratterizzato da masse biancastre nodulari. In 7 soggetti si evidenziavano i linfonodi tracheo-bronchiali aumentati di volume associati a pallore. Al taglio si rilevava diminuzione di consistenza e fragilità. In 1 soggetto, a livello della tonsilla palatina, si evidenziavano emorragie puntiformi diffuse a tutta la superficie dell'organo che, al taglio, si approfondivano a tutto il parenchima dell'organo. Le sezioni istologiche osservate hanno evidenziato lesioni polmonari in 3 soggetti, rappresentate da cellule giganti multinucleate, infiltrati mononucleari peribronchiali (Figura 1) e bronchiolite fibrosa.
In 9 campioni sono state osservate lesioni a livello dei linfonodi tracheo-bronchiali, rappresentate da: necrosi coagulativa, iperplasia dei linfonodi, necrosi emorragica ed emorragia, infiammazione granulomatosa, cellule giganti multinucleate, corpi inclusi intracitoplasmatici (Figura 2). Diversamente, in 8 tonsille palatine si riscontravano le seguenti alterazioni: necrosi emorragica ed emorragie, necrosi coagulativa e cellule giganti multinucleate. Le reazioni di PCR hanno rilevato l'acido nucleico virale in 7 soggetti (Figura 3). Dalle ricerche condotte l'utilizzo della metodica Real-Time PCR su colture cellulari (NSK), inoculate con pool di organi precedentemente menzionati, è stato amplificato il DNA virale da tutti i 16 cinghiali (Figura 4). Per quanto concerne il sequenziamento genomico, condotto su tutti gli isolati, è risultata una percentuale di omologia pari al 95-97% con ceppi di PCV2 di provenienza suina depositati in banca dati (GenBank). In Figura 5 è rappresentato un esempio di allineamento delle sequenze sopramenzionate.

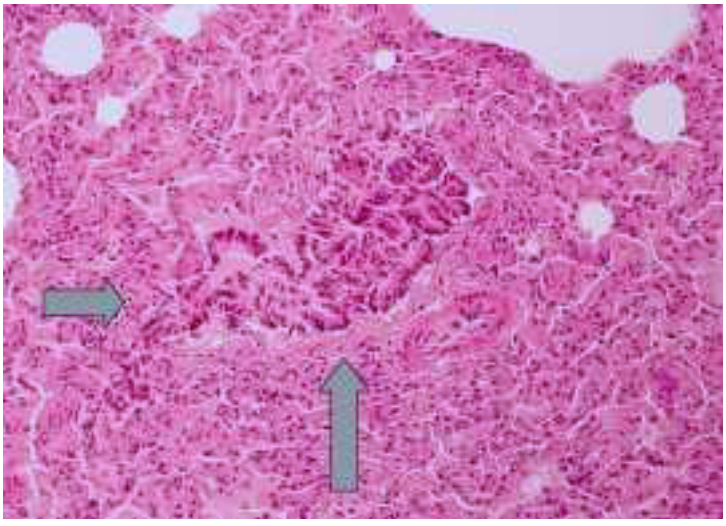


Fig. 1. Polmone – Col. E&E X40 – Infiltrati mononucleari peribronchiali
Fig. 1. *Lung – Col. E&E X40 – Peribronchial mononuclear infiltrates*

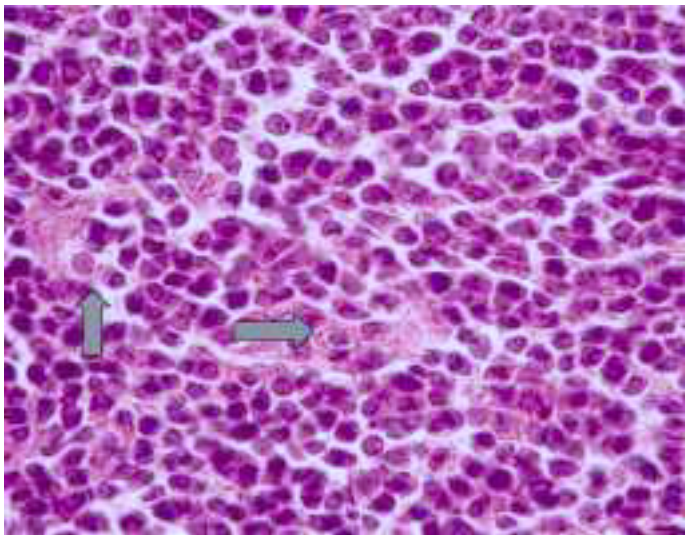


Fig. 2. Linfonodo trache-bronchiale – Col. E&E X40 – Corpi inclusi intracitoplasmatici
Fig. 2. *Lymp node – Col. E&E X40 – Intracytoplasmatic inclusion body*

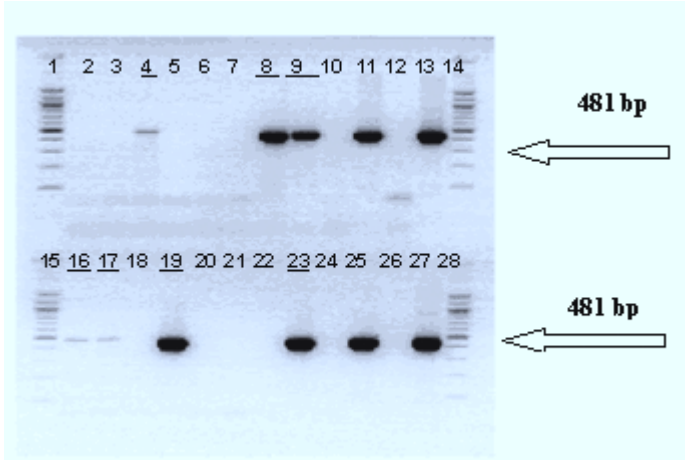


Fig. 3. PCR eseguita su pool di organi. Posizione: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 = pool organi; 10, 24, 12, 26 = controlli negativi; 1, 14, 15, 28 = ladder 100 bp; 11, 25 = controlli positivi di estrazione; 13, 27 = controlli positivi di amplificazione.
Fig. 3. *PCR analysis from pools of organs. Position : 2,3,4,5,6,7,8,9,16,17,18,19,20,21,22,23 = pool organs; 10,24,12,26 = negative controls; 1,14,15,28ladder 100 bp; 11,25 = extraction positive controls; 13,27 = amplification positive controls.*

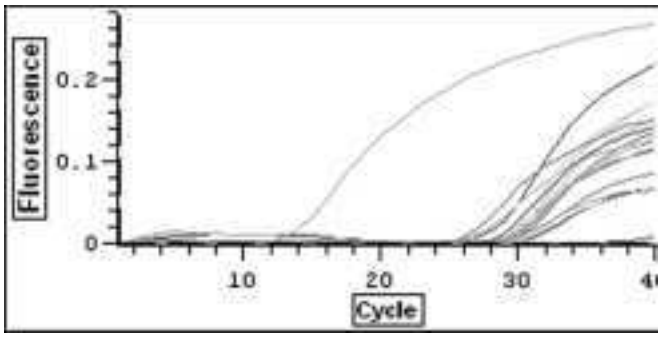


Fig. 4. Real-Time PCR eseguita su surnatante di colture cellulari (NSK) inoculate con pool di organi. I campioni presentano un C_t compreso fra 25 e 32. Il controllo positivo è rappresentato dalla curva a C_t 12.
Fig. 4. *Real-Time PCR from surnatante of cells culture (NSK) inoculated with pools of organs. The samples had C_t from 25 to 32. The positive control is represented with C_t 12.*

Score = 1149 bits (622), Expect = 0.0
Identities = 663/682 (**97%**), Gaps = 6/682 (0%)

Query 1 AGCCATCTTGGCCCAGATCCTCCGCGCCCCCGCCCCTGGCTCCCTTCGCACCCCCGCCACCC 62
Sbjct 1646 AGCCATCTTAG-CCAGATCCTC-CGCCGCCCCCCCTGGCT-CCTC-CACCCCCGCCACCC 1691

Query 63 TTGCACAGATGGAAAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCTGTACCTTTGGA 122
Sbjct 1630 TT--ACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGA 1575

Query 123 TATACTATCAAGCGAACCACAGTCAGAACGCCCTCCTGGCCGGTGGACATGATGAGATTC 182
Sbjct 1574 TATACTATCAAGCGAACCACAGTCAGAACGCCCTCCTGGCCGGTGGACATGATGAGATTC 1515

Query 183 AATATTAATGACTTTCTTCCCGGAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAA 242
Sbjct 1514 AATATTAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAA 1457

Query 243 TACTACAGAATAGGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGT 302
Sbjct 1456 TACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGT 1397

Query 303 CACAGGGGAGTCGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGCCCACA 362
Sbjct 1396 CACAGGGGAGTCGGCTCCAGTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGCCCACA 1337

Query 363 CCCCTCACCTATGACCACTATGTAAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTC 422
Sbjct 1336 CCCCTCACCTATGACCCCTATGTAAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTC 1277

Query 423 TCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCCAAACCTGTGCTAGATTCCACTATTGATTACTTC 482
Sbjct 1276 TCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCCAAACCTGTCCTAGATTCCACTATTGATTACTTC 1217

Query 483 CAACCAAACAACAAAAGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGAC 542
Sbjct 1216 CAACCAAACAACAAAAGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGAC 1157

Query 543 CACTTTAGGCCTCCGCACTGCGTTCTGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGT 602
Sbjct 1156 CACGTAGGCCTCCGCACTGCGTTCTGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGT 1097

Query 603 GTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCTTAA 662
Sbjct 1096 GTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCTTAA 1037

Query 663 TGAATAATAAAAACCATTACGA 684
Sbjct 1036 TGAATAATAAAAACCATTACGA 1015

Fig. 5. Allineamento di una sequenza di PCV2 ottenuta da cinghiale (552/06) con sequenza di riferimento (GenBank) suina -DQ346683.
Fig. 5. *Nucleotide sequenze of PCV2 isolate from wild boar (552/06) with swine DQ346683 reference sequence (GenBank).*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ad oggi l'infezione da PCV2 è associata principalmente ad elevata mortalità nella popolazione suina di tutto il mondo. Le moderne pratiche di management come la vaccinazione e lo svezzamento precoce dei suinetti, favoriscono l'insorgenza dell'infezione e lo sviluppo della PMWS. I risultati conseguiti in questa ricerca hanno permesso di evidenziare che il circovirus suino tipo 2 è presente nella popolazione dei suini selvatici nella Regione Marche. I ceppi di PCV2 circolanti nei cinghiali esaminati hanno evidenziato omologia a livello della regione ORF2 con quelli presenti nella banca dati GenBank nei suidi domestici. I risultati ottenuti da questa ricerca sono in accordo con quelli riportati da altri Autori (3-8). Studi successivi saranno condotti per allestire prove *in vivo* per valutare il grado di patogenicità dei diversi ceppi rilevati.

BIBLIOGRAFIA

Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokkape J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. (1998) "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". Can Vet J; 39: 44-51.

Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. (1999) "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets". J Vet Diagn Invest; 11(1):3-14.

Ellis J, Spinato M, Yong C, West K, McNeilly F, Meehan B, Kennedy S, Clark E, Krakowka S, Allan G. (2003) "Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar". J Vet Diagn Invest; 15(4):364-8.

Ferrari M., Scalvini A., Losio M.N., Corradi A., Soncini M., Bigotti E., Milanesi E., Ajmone-Marsan P., Barlati S., Bellotti D., Tonelli M. (2003) "Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories" J Virol Methods ; 107 (2); 205-212.

Liu C, Wei Y, Zhang C, Lu Y, Kong X. (2007). "Construction and characterization of porcine circovirus type 2 carrying a genetic marker strain". Virus Res; 127: 95-99.

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S. (2000). "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein". J Gen Virol; 81; 2281-2287.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. (2004). "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". J Virol Methods; 117(1):75-80.

Jin W., Joen H., Know H., Yoon B., Han J. (2007) "Cloning and sequence analysis of porcine circovirus type 2 field isolates from PMWS pigs in Korea" 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases – Krakow, 24-27 June 2007.

SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN TEST ELISA PER LA DETERMINAZIONE DEL CORONAVIRUS DELLA DIARREA EPIDEMICA SUINA (PED)

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A PED CORONAVIRUS ANTIGEN DETECTION ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

SOZZI E., LUPPI A., LELLI D., MORENO A., CANELLI E., CORDIOLI P., LAVAZZA A., BROCCHI E.

Parole chiave: diarrea epidemica suina, anticorpi monoclonali, ELISA, diagnosi
Key words: porcine epidemic diarrhoea, monoclonal antibodies, ELISA, diagnosis

Riassunto. La diarrea epidemica suina (PED) è una patologia enterica contagiosa dei suini, sostenuta da un coronavirus. Questo lavoro descrive lo sviluppo di una metodica ELISA per la ricerca del virus PED in campioni di feci. Durante il 2006 e 2007 sono stati esaminati per la ricerca dell'antigene virale 506 campioni provenienti da allevamenti suini ubicati in Pianura Padana ed i risultati confrontati in RT-PCR e con una concordanza del 98%.

Abstract. Porcine epidemic diarrhoea (PED) is a contagious enteric disease of pigs caused by a coronavirus. This paper describes a monoclonal antibodies based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in fecal samples. This work demonstrates the value of the ELISA technique for detecting PEDV on field samples, in a comparative study with RT-PCR. Fecal samples were collected from pig farms located in Pianura Padana during 2006-2007.

Premesse

La diarrea epidemica suina (PED) è una patologia enterica contagiosa dei suini, sostenuta da un coronavirus antigenicamente correlato con il coronavirus umano 229E, il virus della gastroenterite trasmissibile suina ed il virus della peritonite infettiva felina (6).
PEDV è responsabile di una sintomatologia enterica, simile alla gastroenterite trasmissibile (TGE), caratterizzata da diarrea liquida e disidratazione in suini di tutte le età, con alta morbilità e bassa mortalità (6, 7, 8), mentre alcuni autori descrivono casi di infezione in Asia (Giappone, Corea e Cina) con percentuali di mortalità più elevate (30-80%) in suinetti neonati (9).
Segnalata in Europa negli anni '70, da allora, la patologia è stata riconosciuta nelle aree ad alta densità di popolazione suina in tutto il mondo (6). In Italia, la frequenza di focolai di PED, è sporadica, anche se nell'autunno – inverno 2005-2006 si è assistito

alla comparsa di una forma epizootica della malattia, che ha interessato numerosi allevamenti suini a ciclo chiuso ed ingrasso delle zone della Pianura Padana dedite alla suinicoltura.. Le infezioni da virus PED sono annoverate insieme con altri agenti patogeni enterici fra le cause di perdite produttive nell'allevamento suino. Per la ricerca del virus della diarrea epidemica suina le tecniche diagnostiche tradizionali sono basate sulla evidenziazione diretta del virus, attraverso la microscopia elettronica che si basa sull'osservazione delle caratteristiche morfologiche virali, e/o sulla dimostrazione dell'antigene virale nell'epitelio intestinale tramite immunofluorescenza indiretta (IF). Questo lavoro descrive lo sviluppo di una metodica ELISA, basata sull'impiego di anticorpi monoclonali (AcM), per la rivelazione dell'antigene virale in campioni fecali di soggetti con sintomatologia enterica o di contenuto intestinale di animali venuti a morte. Questo test è stato, successivamente, impiegato per monitorare la diffusione e la trasmissione delle infezioni da PEDV in allevamenti della Pianura Padana nel periodo 2006-2007 ed i risultati confrontati con quelli ottenuti tramite RT-PCR per la dimostrazione dell'RNA virale.

MATERIALI E METODI

Virus Il ceppo di referenza di PEDV (CV 777), gentilmente fornito dal Prof. M. Pensaert, dell'Università di Medicina Veterinaria di Gent, Belgio, è stato propagato in cellule Vero, secondo le indicazioni di Hofmann and Wyler (3).
Anticorpi Monoclonali Per la produzione degli anticorpi monoclonali sono stati immunizzati topi Balb/c secondo la metodica standardizzata (2). Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante ELISA indiretta con antigene parzialmente purificato e in immunofluorescenza indiretta su cellule infettate. Per verificare la validità del test ELISA sono state esaminate con diverse combinazioni di AcM tessuto colture di virus appartenenti al genere coronavirus e non e parte dei campioni patologici precedentemente esaminati in RT-PCR.
Campioni patologici Per le indagini virologiche sono stati utilizzati omogenati di intestini di soggetti venuti a morte o campioni di feci di suini, con sintomi clinici e lesioni anatomo-patologiche riferibili a malattia enterica acuta, conferiti presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica dell'IZSLER di Brescia nel periodo di tempo compreso tra il 2006 e il 2007.. In totale sono stati esaminati 506 campioni. Il materiale patologico è stato risospeso in phosphate buffer saline (PBS) 1/10, centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti e il surnatante stoccato a -70°C.
RT-PCR Per la ricerca del genoma virale sono stati impiegati primers specifici per amplificare una porzione del gene codificante per la glicoproteina S (spike), secondo la metodica descritta da Kim et al. (4). Le sequenze dei primers sono riportate nella tabella 1.

Tab. 1. Primers impiegati e dimensioni del prodotto amplificato.
Tab. 1. *Primers used and size of the amplified product.*

Primers	sequences (5'→ 3')	position (on the s gene)	size of the amplified product
P1	TTCTGAGTCACGAACAGCCA	1.466-1.485	651bp
P2	CATATGCAGCCTGCTCTGAA	2.097-2..116	

L'RNA virale è stato estratto partendo da 200 µl di campione fecale/intestinale, diluito 1/10 in PBS, impiegando un protocollo, che prevede l'uso di Trizol, modificato rispetto al metodo proposto da Chomczynsky e Sacchi (1987). L'RNA è stato retrotrascritto ed amplificato utilizzando un kit one-step del commercio (One Step Rt PCR kit – Qiagen). La reazione di retrotrascrizione ed amplificazione è stata condotta in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem), secondo il seguente profilo termico: 30 minuti a 50°C, 15 minuti a 95°C, 40 cicli costituiti da 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 53°C e 30 secondi a 72°C ed un'estensione finale di 7 minuti a 72°C. Gli amplificati sono stati analizzati su gel di agarosio all'1.5% per valutare la presenza delle bande attese.
ELISA sandwich Per la dimostrazione dell'antigene virale è stata allestita una *double antibody sandwich* ELISA (DAS-ELISA) basata sull'impiego di piastre microtitre sensibilizzate con un AcM anti-PEDV, diluito in tampone carbonato-bicarbonato alla concentrazione d'uso, e incubate per una notte a 4°C. Dopo avere eseguito tre cicli di lavaggio sono stati aggiunti i campioni in esame in doppio ed in due diluizioni (non diluito e 1:2), insieme con i controlli positivo e negativo (rispettivamente coltura cellulare di Vero infetta e non infetta PEDV). In seguito ad incubazione per 1 ora a 37°C e ulteriore ciclo di 3 lavaggi, è stato aggiunto l'AcM coniugato con perossidasi. Sono stati considerati positivi i campioni che alla diluizione iniziale presentavano valori di densità ottica > 0.2 OD.
Analisi statistica La concordanza tra le metodiche ELISA e RT-PCR è stata valutata con il calcolo del valore statistico kappa (5).

RISULTATI

Anticorpi monoclonali Attraverso 3 procedimenti di fusione sono stati ottenuti 47 ibridomi producenti AcM reattivi verso l'antigene immunizzante. Le prove di reattività in immunofluorescenza e in ELISA indiretta hanno permesso di identificare 6 AcM specifici per PED, successivamente purificati mediante cromatografia di affinità e marcati con perossidasi. Sulla base dei risultati ottenuti con le diverse combinazioni di AcM, rispettivamente impiegati come anticorpi cattura e marcati, sono stati selezionati due AcM, che utilizzati per l'allestimento della DAS-ELISA meglio rispondono alle esigenze di specificità e sensibilità: 4C3 impiegato come cattura e 1F12 come coniugato.
Valutazione del test virologico DAS-ELISA Il test ELISA è stato valutato impiegando la RT-PCR come test di riferimento per la ricerca virologica di PED. I campioni patologici sono stati esaminati in parallelo con le due metodiche ed i risultati riportati in tabella 2.

Tab. 2. Confronto tra le metodiche ELISA e RT-PCR per la determinazione di PEDV.
Tab. 2. *Comparison of PEDV RT-PCR and ELISA detection.*

	RT-PCR		
ELISA	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	48	7	55
Negativo	2	449	45
Totale	50	456	506

Kappa= 0,98

Dei 506 campioni esaminati per la ricerca di PEDV, 48 sono risultati positivi e 449 negativi con entrambe le metodiche. 7 campioni sono risultati positivi solo in ELISA, mentre 2 campioni, negativi in ELISA, hanno dato esito positivo in RT-PCR.
Il valore Kappa pari a 0,98 afferma che il test ELISA ha un'efficienza del 98% rispetto alla RT-PCR e conferma l'elevata concordanza con il test di riferimento.

Discussione e conclusioni

Per lo studio della trasmissione e della diffusione di questa patologia sono stati messi a punto diversi metodi diagnostici sempre più accurati, rapidi e diretti ed in questo lavoro è stata messa a punto una metodica ELISA che impiega anticorpi monoclonali per la rilevazione dell'antigene di PEDV.. La metodica è stata, quindi, impiegata testando 506 campioni di feci o omogenati di intestino e comparata con una RT-PCR, che utilizza primers specifici per amplificare una porzione del gene codificante per la glicoproteina S del coronavirus della PED. Le positività riscontrate rappresentano il 9,8-10,8% dei campioni esaminati, la maggior parte delle quali è stata rilevata all'inizio del 2006 durante l'epizoozia di PED che ha interessato il nord Italia nell'autunno-inverno 2005-2006, e confermano che PEDV tende ad essere autolimitante e che gli episodi clinici costituiscono eventi sporadici. Il test ELISA ha dato risultati sovrapponibili agli esiti ottenuti in RT-PCR, ma l'occasionale riscontro di risultati non concordanti (2 campioni positivi in RT-PCR e negativi in ELISA e 7 negativi in RT-PCR e positivi in ELISA) può essere attribuito a diverse situazioni che possono verificarsi: campioni falsi-negativi in ELISA sono da imputarsi probabilmente al prelievo di animali in fase cronica con presenza di anticorpi e di immunocomplessi che non permettono la rivelazione dell'antigene o ad errori di conservazione del campione. Reazioni false-positive possono essere dovute, come descritto da Brandt et al nel 1981, alla presenza nel campione da esaminare di batteri intestinali o di loro prodotti che legano in maniera aspecifica gli anticorpi impiegati come reagenti in ELISA. Al contrario, risultati falsi-negativi in RT-PCR possono essere influenzati dalla tecnica di estrazione dell'RNA, anche se prove successive, nelle quali è stato impiegato un kit del commercio per la purificazione di RNA virale da materiale patologico, non ha dato risultati differenti da quelli ottenuti con il protocollo di estrazione che prevede l'uso di Trizol. Un altro problema potrebbe essere attribuito alla presenza di inibitori enzimatici della reazione PCR nelle feci: a tal

proposito è stata condotta una prova, nella quale un campione di feci negativo in ELISA e RT-PCR e un altro positivo in ELISA e negativo in RT-PCR sono stati contaminati con diluizioni in base 10 dalla -1 alla -5 del virus PED CV777 propagato in cellule Vero. La metodica RT-PCR impiegata ha evidenziato la positività per il primo campione alle diluizioni da 10^{-1} a 10^{-4}, mentre per il secondo da 10^{-1} e alla 10^{-2}, confermando che inibitori enzimatici possono limitare l'efficienza della metodica (Fig. 1).

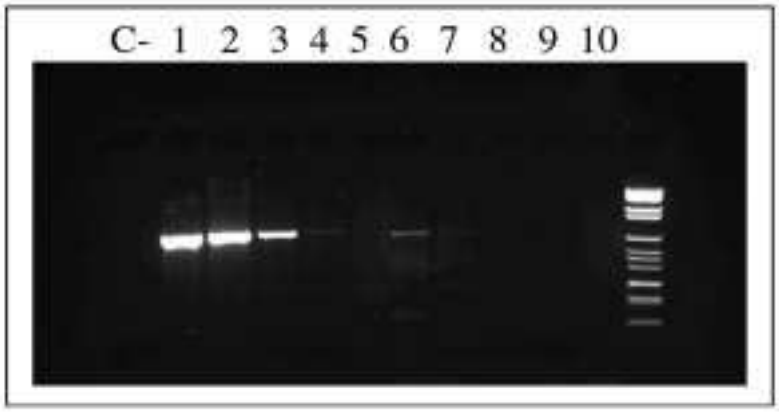


Fig. 1. Prova di contaminazione di 2 campioni di feci con PEDV CV777/Vero: campione n°1 negativo PEDV in RT-PCR ed ELISA, 1) PEDV 10^{-1} 2) PEDV 10^{-2} 3) PEDV 10^{-3} 4) PEDV 10^{-4} 5) PEDV 10^{-5}. Campione n° 2 negativo PEDV in RT-PCR e positivo in ELISA, 6) PEDV 10^{-1} 7) PEDV 10^{-2} 8) PEDV 10^{-3} 9) PEDV 10^{-4} 10) PEDV 10^{-5}.
Fig.1. *Contamination of 2 stool samples with PEDV CV777/Vero: Sample 1 PED RT-PCR and ELISA negative, 1) PEDV 10^{-1} 2) PEDV 10^{-2} 3) PEDV 10^{-3} 4) PEDV 10^{-4} 5) PEDV 10^{-5}. Sample 2 PEDV RT-PCR negative and ELISA positive, 6) PEDV 10^{-1} 7) PEDV 10^{-2} 8) PEDV 10^{-3} 9) PEDV 10^{-4} 10) PEDV 10^{-5}.*

I risultati ottenuti con questo studio hanno permesso di identificare, con una metodica rapida e di facile utilizzo, animali con sintomatologia enterica infetti PED.
La metodica ELISA messa a punto risulta essere in grado di rilevare la presenza dell'antigene virale in campioni costituiti da materiale patologico in animali venuti a morte o in feci di animali con forma clinica riferibile a malattia enterica, permette l'interpretazione oggettiva dei risultati e l'impiego degli anticorpi monoclonali presenta notevoli vantaggi dovuti alle caratteristiche di inesauribilità e standardizzazione. Risulta, quindi, uno strumento da impiegare per la diagnosi di infezione con il virus della diarrea epidemica suina, per la diagnosi differenziale in allevamenti con problematiche di diarree persistenti e per approntare studi epidemiologici di questa patologia.

Bibliografia

Brandt C.D., Kim H.W., Rodriguez W.J., Thomas L., Yolken R.H., Arrobio J.O., Kapikian A.Z., Parrott R.H. and Chanock R.M. (1981) "Comparison of direct electron microscopy and rota-

virus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children". J. Clin. Microbiol. 13: 976-981.
Galfre G. and Milstein C. (1981) "Preparation of monoclonal antibodies, strategies and procedure". Methods Enzymol. 73: 3-5.
Hofmann M. and Wyler R., (1988) "Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhoea in cell culture". J. Clin. Microbiol. 26: 2235-2239.
Kim SY., Song DS, Park BK. (2001) "Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR". J. Vet. Diagn. Invest. 13 (6): 516-520..
Landis J.R. and Koch G.G. (1977) "The measurement of observer agreement for categorical data". Biometrics, Vol. 33, n°1, 159-174.
Pensaert M.B. and Yeo S.G. (2006) Porcine epidemic diarrhea in Diseases of Swine 9TH Edition: 367-372.
Pensaert MB. and DeBouck P. (1978) "A new coronavirus – like particle associated with diarrhea in swine". Arch. Virol. 58 (3): 243-7.
Pritchard G.C., Paton D.J., Wibberley G., Ibata G. (1999) "Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain". Vet. Rec. 144 (22), 616-618.
Shibata I., Ono M., Mori M. (2001) "Passive protection against porcine epidemic diarrhoea (PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows". J. Vet. Med. Sci. 63, 655-658.

SENSIBILITÀ DI SUINI DI RAZZA LARGE WHITE E LANDRACE SPERIMENTALMENTE INFETTATI CON PRRSV

SUSCEPTIBILITY OF PURE BRED LARGE WHITE AND LANDRACE PIGS TO EXPERIMENTAL INFECTION WITH PRRSV

[1]P. CANDOTTI, [1]S. DOTTI, [2]S. GUANA, [3]S. ROTA NODARI, [1]M. AMADORI, [1]R. VILLA, [4]S. PETRINI, [1]G. LOMBARDI, [1]M. FERRARI
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale "B. Ubertini", Brescia, [2]DVM Libero Professionista, Trento, [3]DVM ASL, Brescia, [4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Parole chiave*: Large White, Landrace*, PRRSV, infezione sperimentale
Key words: *Large White, Landrace*, PRRSV, *experimental infection*

Riassunto. Ventotto suini di trenta giorni di vita e di linee genetiche diverse: quattordici *Large White* e quattordici *Landrace*, sono stati sperimentalmente infettati con il virus della PRRS.. La prova è durata trenta giorni e gli animali sono stati clinicamente, virologicamente e immunologicamente monitorati al fine di evidenziarne eventuali differenze alla infezione.. I dati raccolti sembrano evidenziare una sintomatologia clinica più evidente nei soggetti *Large White* e ciò potrebbe essere in relazione ai differenti valori di IL-10 sierica, IFN-γ SC e IgM, registrati nelle due linee genetiche.

Abstract. In this study, twenty pigs, thirty day old of two different pure bred lines: fourteen Large White and fourteen Landrace, were experimentally infected with PRRS virus. The animals were investigated for thirty days by clinical, virological and immunological tests, to compare the infection response differences between two pig lines. The collected data seem to evidence a more severe clinical sign in Large White animals than in Landrace and this finding could be in relationship with different values of IL-10, IFN-γ SC and IgM, that were detected in the two pure bred lines.

INTRODUZIONE

La Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRS) è, da alcuni anni, oggetto di ricerche mediante infezioni sperimentali e indagini di campo, al fine di comprendere in modo corretto la patogenesi del virus e la sua interazione con l'ospite. Infatti, le misure di *management* sanitario e le strategie vaccinali non si sono dimostrate, sino ad ora, sufficienti al fine di contenere le notevoli perdite economiche che si verificano quando un allevamento si infetta.
Per questo, la maggiore conoscenza del meccanismo patogenetico e della risposta immunitaria sembrano essere i punti più importanti per contrastare l'azione del virus.
Scopo di questo studio è stato valutare e confrontare la sensibilità di due linee geneti-

che, *Large White* e *Landrace*, nei confronti della infezione sperimentale con PRRSV, mediante indagini cliniche, virologiche ed immunologiche.

MATERIALI E METODI

Suini: si sono utilizzati 28 suini PRRSV-*free*, di 30 gg di età, 14 *Large White* (LW) e 14 *Landrace* (L); allevati in isolamento in due gruppi separati, con temperatura e ventilazione controllate. Ciascuna linea è stata ulteriormente divisa in due gruppi:
1 gruppo linea-LW: suini infettati dal n.1 al n.12, controlli n.13-14
2 gruppo-linea L, suini infettati .dal n.1 al n.12, controlli n.13-14
Infezione sperimentale: per via orale e endo-nasale con 2 ml di PRRSV ($10^{4,24}$ $TCID_{50}$/ml) per ciascuna via. Sono stati sottoposti a valutazioni cliniche, virologiche e immunologiche durante tutti i 30 gg *post*-infezione (GPI).
Osservazione clinica: clinicamente, gli animali sono stati sottoposti ad esame obiettivo generale.
Indagini di laboratorio: per il controllo della viremia sia i gruppi infettati come quelli di controllo, sono stati valutati mediante *Real-Time* RT-PCR. La risposta umorale, presenza di IgM indagate dal giorno 0 al 21° e di IgG dal giorno 0 al 30°, è stata valutata mediante ELISA utilizzando *kit* commerciali (IgM LSI PRRS/SDRP, IgG-HerdCheck PRRS IDEXX Labs.); la presenza di anticorpi sieroneutralizzanti (SN) è stata determinata dal 30° giorno, la produzione di cellule secernenti IgA mediante tecnica *ELISpot* dal giorno 0 al 30° (3). Inoltre, si è controllata anche la risposta cellulo-mediata (CMI), con la valutazione della proliferazione linfocitaria mediante incorporazione di ^{3}H-TdR, la presenza di IL-10 mediante tecnica ELISA e la presenza di cellule secernenti IFN-γ con test ELISpot (*Pierce Endogen Starter Kit)*.

RISULTATI

Osservazioni cliniche: tutti i suini infettati del gruppo LW hanno presentato ipertermia (>39,7° C) dal giorno 1° al 21°. L'esame obiettivo generale ha messo in evidenza una sintomatologia caratterizzata da: letargia, tachipnea, tremori, edema palpebrale, tosse, dispnea ed iperplasia dei linfonodi inguinali (fino al 21° giorno). Tra il 10° e il 20° giorno sono morti 4 soggetti. Alla necroscopia si è evidenziata polmonite interstiziale, splenomegalia ed iperplasia dei linfonodi inguinali (1). Gli animali infetti del gruppo L hanno mostrato ipertermia (>39,7° C) fino al 21° giorno, con una sintomatologia più lieve rispetto al gruppo LW e caratterizzata da: letargia, edema palpebrale e leggera iperplasia dei linfonodi inguinali. Nel gruppo L tutti gli animali sono sopravvissuti all'infezione; alla fine dei 30 gg, i soggetti sono stati sacrificati e, all'esame necroscopico, hanno evidenziato: splenomegalia ed una lieve iperplasia dei linfonodi inguinali. Le indagini microbiologiche non hanno evidenziato la presenza di infezioni batteriche secondarie.
Indagini di laboratorio. Dal punto di vista virologico, i gruppi sottoposti ad infezione hanno presentato viremia dal 2° fino al 30° giorno. Le analisi sierologiche sugli anima-

li del gruppo LW hanno evidenziato lievi livelli di IgM (346 di densità ottica), mentre nel gruppo L, le IgM si sono mostrate più elevate a partire dal 9°giorno (1090 di densità ottica); invece, per le IgG, in entrambi i gruppi infetti, si sono rilevati valori elevati a partire dal 14° giorno (LW 0,9 S/P; L 1.09 S/P) fino al termine della prova sperimentale. Mentre, gli anticorpi sieroneutralizzanti non sono stati evidenziati.
I livelli di IL-10 nei campioni sierici hanno evidenziato al 14° giorno un aumento nei suini del gruppo infetto LW, con una successiva diminuzione fino al termine della prova; nel gruppo L dei suini infetti, i valori di IL-10 iniziavano da livelli più elevati al giorno 0 (60 pg/ml), per aumentare al 9°giorno e successivamente diminuire fino al 30° (Fig. 1). Le cellule secernenti (SC) IFN-γ presentavano un incremento a partire dal 9° giorno, con un andamento costante nel gruppo infetto LW; nei suini *Landrace*, invece, si riscontravano sempre valori di base più elevati (40x10^{5}cell/Perypheral Blood Mononucleate Cells), con un picco al 9°, 14° e 30° giorno (85x10^{5}cell/PBMC) e livelli minori al 21° giorno (20x10^{5}cell/PBMC) (Fig. 2).

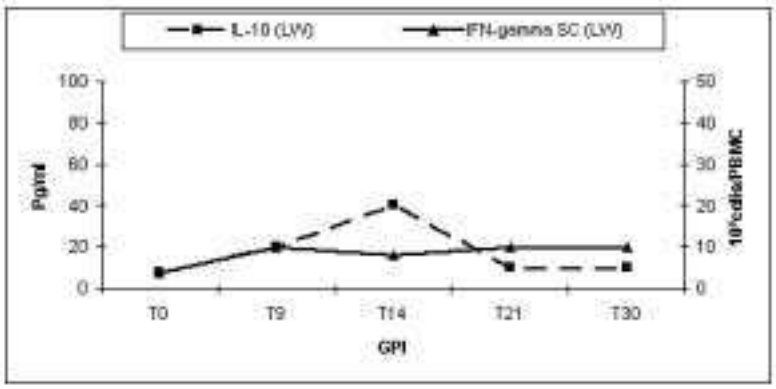


Fig. 1. IL-10 e IFN-γ SC in suini Large White infettati con PRRSV.
Fig. 1. *IL-10 and IFN-γ SC in Large White pigs infected with PRRSV*

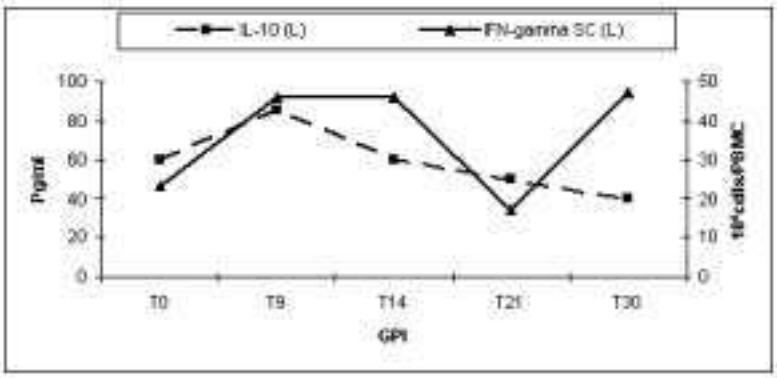


Fig. 2. IL-10 e IFN-γ SC in suini Landrace infettati con PRRSV
Fig. 2. *IL-10 and IFN-γ SC in Landrace pigs infected with PRRSV*

Per quanto riguarda la proliferazione linfocitaria e le cellule secernenti IgA, non si è evidenziato un aumento in seguito all'infezione in nessuno dei due gruppi.
I soggetti di controllo (LW e L) si sono mantenuti virologicamente e sierologicamente negativi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca hanno indicato che la sintomatologia clinica e le lesioni anatomo-patologiche presentate dai suini di razza *Large White*, erano più evidenti rispetto a quelle dei suini *Landrace*, in condizioni sperimentali. Inoltre, è stata rilevata una differenza nei valori iniziali (T0) di IL-10 sierica e di IFN-γ SC in entrambe le linee genetiche, maggiore nei *Landrace* rispetto ai *Large White*. In particolar modo, nel gruppo LW i valori di IFN-γ SC sono risultati più elevati durante la fase acuta dell'infezione. Questi dati, insieme ai minori livelli di IL-10 e ai maggiori livelli di IgM nei suini *Landrace*, sembrerebbero suggerire da un lato una stimolazione più precoce della risposta immunitaria rispetto a quanto evidenziato nei *Large White* e, dall'altro, una differente interazione virus-ospite.
Tali risultati dovranno essere ulteriormente valutati mediante test *in vitro* e *in vivo* (2).

Il lavoro è stato parzialmente finanziato dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

Candotti P., S. Dotti, S. Guana, S. Rota Nodari, M. Amadori, R. Villa, S. Petrini, G. Lombardi, M. Ferrari (2007) "Clinical, virological and immunological investigations on purebred large white pigs experimentally infected with porcine respiratory and reproductive virus (PRRSV)" in: 5th International Symposium On Emerging and Re-Emerging Pig Disease, 24th – 27th June Krakow, Poland, 161

Diaz I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, and E. Mateu (2005) "Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus" J. Gen. Virol. 86 1943-1951 .

Larsen D.L., . Karasin A, Zuckermann F., Olsen C. W. (2000) "Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs" Vet. Microbiol. 74 117-131

EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IDENTIFICATI IN SUINI ITALIANI CON DIFFERENTI QUADRI PATOLOGICI

EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) STRAINS IDENTIFIED IN ITALIAN PIGS AFFECTED BY DIFFERENT PATHOLOGICAL CONDITIONS

MARTELLI F.[1], TOMA S.[1], DI BARTOLO I.[2], INGLESE N.[2], CAPRIOLI A.[4], RUGGERI F.M.[2], LELLI D.[3], BONCI M.[3], OSTANELLO F.[1]

[1]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna; [2] Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità; [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna; [4] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana

Parole chiave: Virus dell'epatite E (HEV), Suino, Epidemiologia, PRRSV, PCV2, analisi filogenetica

Key words: Hepatitis E Virus (HEV), Swine, Epidemiology, PRRSV, PCV2, philogenetic analysis

Riassunto. Nell'uomo, l'epatite E è una malattia infettiva ad eziologia virale che evolve clinicamente in forme di epatite acuta. L'agente eziologico (Hepatitis E virus, HEV) è un RNA virus di piccole dimensioni attualmente classificato nel genere Hepevirus, famiglia *Hepeviridae*. Recentemente, numerose evidenze supportano l'ipotesi che l'epatite E sia una zoonosi emergente e che il suino possa essere il principale serbatoio animale dell'infezione. Ceppi di HEV di origine suina sono stati per la prima volta identificati nel 1997 negli USA e attualmente l'infezione da HEV è considerata endemica negli allevamenti suinicoli di numerosi paesi, Italia compresa. Nel suino, l'infezione da HEV sembra evolvere in maniera asintomatica, anche se alcuni studi hanno messo in evidenza la possibile correlazione tra questa ed alterazioni a carico del fegato. Inoltre, non sono stati ancora chiariti i possibili effetti di eventuali interazioni tra il virus e altre infezioni concomitanti quali quelle sostenute da PCV2 o PRRSV. Nel presente lavoro è stata valutata, mediante una tecnica di nested-RT-PCR, la prevalenza di HEV in 137 suini di 2-4 mesi di età provenienti da 45 allevamenti del Nord Italia e deceduti o soppressi a causa della presenza di forme patologiche. La prevalenza riscontrata è stata del 29,9%. La valutazione della correlazione tra l'infezione e la presenza di eventuali fattori di rischio non ha messo in evidenza nessuna associazione statisticamente significativa per quanto riguarda tipologia di allevamento, presenza di forme patologiche concomitanti o coinfezione con PRRSV o PCV2. La positività per HEV è risultata invece significativamente più elevata in animali di 80-120 giorni di vita rispetto a quelli di età <80 giorni (20%). Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, i ceppi identificati, sono risultati tutti appartenere al genotipo 3 e sono risultati simili ad altri ceppi di origine umana e suina identificati in Europa.

Summary. In humans hepatitis E (HE) is an infectious viral disease with clinical and morphological features of acute hepatitis. The aetiological agent is the hepatitis E virus (HEV). Increasing evidence supports the hypothesis that HE is an emerging zoonotic disease, and that pigs are the main animal reservoir of the infection.Swine HEV was first identified in 1997 in USA and is now considered to be widespread in pig herds all over the world. In general HEV in pigs seems to be sub-clinical, although some studies have put in evidence a possible correlation of the infection with liver damages. Moreover its possible interaction with other pig pathogens such as porcine PCV2 and PRRSV has still to be fully clarified. In this study we assessed, using a nested-RT-PCR, the HEV prevalence in 137 pigs of 2-4 months of age from 45 different Italian herds and affected by different pathological conditions, finding that HEV infection is largely widespread in Italian pigs (29.9% prevalence). We also performed an evaluation of possible risk factors related to the infection, finding no statistically significant correlations between HEV positivity and herd typology or presence of concomitant pathological conditions and coinfections with PRRSV or PCV2. However, the HEV positivity was significantly higher in animals between 80-120 days of age than in pigs <80 days of age (20%). We also performed the molecular characterization of the identified strains, finding that all of them belonged to genotype 3 and were similar to other European swine and humans strains.

INTRODUZIONE

L'epatite E è una malattia infettiva emergente ad eziologia virale che nell'uomo si presenta con caratteristiche cliniche di epatite acuta e tassi di letalità prossimi al 2% ma che possono superare il 20% nelle donne in gravidanza. L'agente eziologico (Hepatitis E virus, HEV) è un RNA virus di piccole dimensioni attualmente classificato nel genere Hepevirus, famiglia Hepeviridae (Panda et al., 2007). La malattia costituisce un grave problema di Sanità Pubblica soprattutto nei paesi in via di sviluppo, dove si trasmette principalmente per via oro-fecale attraverso il consumo di acqua o alimenti contaminati e dove i focolai, spesso epidemici, raggiungono estese proporzioni (Emerson e Purcell, 2003). Nei paesi industrializzati, Italia compresa, l'andamento dell'infezione è sporadico. Tuttavia, il numero di casi autoctoni, cioè descritti in soggetti senza anamnesi di viaggi in aree considerate ad alto rischio è in aumento. Nella popolazione sana dei paesi industrializzati sono state inoltre rilevate sieroprevalenze talvolta superiori al 20% (Emerson e Purcell, 2003).

Fino ad oggi sono stati identificati 4 maggiori genotipi virali: in Asia e Africa la maggior parte delle infezioni sono sostenute dal genotipo 1, mentre il genotipo 2 prevale in Messico e Nigeria e Ciad (Panda et al., 2007; Zheng et al., 2006). Nei paesi industrializzati sono stati descritti solo ceppi appartenenti ai genotipi 3 e 4 (Lu et al., 2006). Il genotipo 3 prevale in USA, Europa e Nuova Zelanda mentre il 4 in Cina, Taiwan, Giappone, India, Indonesia e Vietnam (Zheng et al., 2006; Lu et al., 2006).

Nel 1997 fu identificato per la prima volta il virus dell'epatite E del suino (Swine, Hepatitis E Virus, Swine HEV - swHEV) (Meng et al., 1997). Questo virus fu geneti-

camente e filogeneticamente correlato a 2 ceppi umani isolati negli USA da pazienti colpiti da epatite E senza anamnesi di viaggi all'estero (Meng et al., 1997). Da allora, ceppi di HEV di origine suina, in larga maggioranza appartenenti al genotipo 3 o 4, sono stati isolati praticamente in tutto il mondo ed è stata frequentemente osservata una spiccata analogia nucleotidica tra questi ed i ceppi umani provenienti dalle stesse regioni geografiche (Banks et al.; 2004). Infezioni sperimentali hanno inoltre dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani (Meng et al., 1998, Kasorndorkbua et al., 2003; Arankalle et al., 2006) ed alcuni studi hanno riportato di un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti professionalmente esposti al contatto con suini (Hsieh et al., 1999; Drobenuich et al., 2001; Meng et al., 2002; Withers et al., 2002; Siochu et al., 2004). L'evidenza diretta della possibilità di trasmissione zoonosica dell'HEV è infine arrivata nel 2003 dal Giappone, dove alcuni casi di epatite E sono stati associati all'ingestione di carne o organi crudi di suino, cinghiale e cervo poche settimane prima dell'inizio dei sintomi (Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003; Yazaki et al., 2003; Tamada et al., 2004). Oggi HEV è considerato un agente di zoonosi emergente ed il suino il principale reservoir animale del virus, potenzialmente fonte di trasmissione per l'uomo sia per contatto diretto con secreti, escreti ed organi contaminati, sia per via alimentare con prodotti alimentari non sottoposti ad adeguata cottura.

Nei suidi, la patogenicità e gli effetti dell'infezione sono ancora oggetto di studio. In animali inoculati sperimentalmente e naturalmente infetti è stato rilevato che il più delle volte HEV è in grado di provocare infezioni sub-cliniche con segni di epatite rilevabile solo a livello istologico (Meng et al., 1998; Caprioli et al, 2007). Atri studi hanno tuttavia rilevato come l'infezione sia in grado di provocare danni epatici anche di una certa gravità (Lee et al., 2007), mentre alcuni Autori ritengono che HEV, di per sé scarsamente patogeno, possa agire in sinergia con altri agenti virali come ad esempio PCV2 e PRRSV (Martin et al., 2007).

In Italia l'infezione è stata di recente descritta in forma apparentemente sub-clinica in diversi allevamenti suinicoli del Nord, con una prevalenza media del 42%, in soggetti di diversa età e categoria produttiva, compresi animali prossimi alla macellazione (Di Bartolo et al., 2007). Tuttavia molto resta da chiarire riguardo l'epidemiologia, la patogenesi ed il potenziale zoonotico del virus nel nostro Paese.

In particolare, dal punto di vista zootecnico, non sono stati ancora investigati i possibili effetti dell'infezione sulla resa produttiva degli animali e le eventuali interazioni tra questa e altre infezioni o patologie concomitanti.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la valutazione della presenza di HEV in suini deceduti o soppressi a causa della presenza di diverse forme patologiche e pervenuti a scopo diagnostico all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), la valutazione dell'eventuale correlazione tra l'infezione e la presenza di patologie concomitanti, l'identificazione di eventuali fattori di rischio legati all'infezione e l'effettuazione di indagini molecolari e filogenetiche sui ceppi identificati.

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni

Sono stati esaminati 137 suini di età compresa tra 2 e 4 mesi, selezionati in modo casuale tra quelli inviati a scopo diagnostico presso le sezioni di Brescia e Reggio-Emilia dell'IZSLER. Gli animali esaminati provenivano da 45 allevamenti diversi del Nord Italia.

Per ogni suino, sono state raccolte informazioni relative a: età (lattoni o magroni), tipologia dell'allevamento di provenienza (ciclo aperto, chiuso, ingrasso, centro genetico) e presenza di patologie concomitanti evidenziate in sede autoptica o mediante indagini di laboratorio. I microrganismi ricercati mediante le indagini di laboratorio variavano in funzione del sospetto diagnostico e/o in funzione del quadro anatomopatologico riscontrato.

Le patologie riscontrate sono state classificate in base alla localizzazione preminente delle lesioni in: patologie gastroenteriche, epatiche, polmonari o multiple (quando veniva evidenziato il coinvolgimento di più di un organo/apparato).

Per la ricerca di HEV, da ogni animale è stato prelevato un campione di bile, successivamente diluito 1:10 e conservato a -80° C, fino all'esecuzione delle prove di laboratorio.

Ricerca dell'RNA di HEV mediante nested-RT-PCR

A partire da 140 ul della soluzione di bile diluita 1:10 è stata effettuata l'estrazione dell'RNA da cui è stato amplificato un segmento del genoma virale mediante un protocollo di nested-RT-PCR, utilizzando due diversi set di primers: conA1-conS1, conA2-conS2 (Erker et al. 1999); 3156-3157, 3158-3159 (Huang et al., 2002).

I prodotti ottenuti in nested-RT-PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% e alcuni campioni positivi, scelti in maniera casuale, sono stati successivamente purificati e sequenziali allo scopo di confermare l'identità del prodotto ottenuto e per l'esecuzione di analisi molecolari.

Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica delle sequenze ottenute è stata effettuata con il software DNASIS Max 2.0 e il dendrogramma è stato costruito con il software Bionumerics software packages (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) con il metodo UPGMA.

Analisi statistica

La prevalenza per HEV è stata esaminata in funzione dei seguenti fattori di rischio: età, tipologia di allevamento, presenza di lesioni anatomopatologiche macroscopiche, diagnosi dell'infezione da PRRSV o PCV2.

L'analisi è stata condotta inizialmente mediante una procedura bivariata, utilizzando il test chi-quadrato, prendendo in considerazione i singoli fattori di rischio. Successivamente è stata condotta un'analisi multivariata utilizzando una procedura di regressione logistica.

RISULTATI

Quarantuno dei 137 campioni analizzati (29,9%) sono risultati positivi per HEV con almeno uno dei due set di primers utilizzati.
Non sono state rilevate associazioni statisticamente significative tra la diagnosi di infezione da HEV e la presenza di patologie concomitanti, o le diverse tipologie di allevamento esaminate. I risultati dell'analisi multivariata indicano che i soggetti in magronaggio (età 80-120 giorni) presentavano tuttavia una probabilità di essere infetti significativamente più elevata rispetto ai soggetti più giovani (Odd Ratio=3,78; p:0,009). Nei magroni, infatti, la prevalenza riscontrata era nettamente più elevata (46,9%) rispetto ai soggetti in svezzamento (20%), (tab. 1).

Tab. 1. Risultati dell'analisi di regressione logistica
Tab. 1. *Results of the logistic regression analysis*

		Positivi/esaminati	Prevalenza (%)	OR	IC 95%	P
Età (giorni)	<80	17/85	20,0	-	-	-
	80-120	23/49	46,9	3,78	1,39-10,26	0,009
Patologia epatica	Presente	6/24	25,0	0,60	0,18-2,04	0,413
	Assente	35/113	31,0	-	-	-
Patologia intestinale	Presente	20/58	34,5	1,43	0,55-3,72	0,457
	Assente	21/79	26,6	-	-	-
Patologia polmonare	Presente	28/81	34,6	2,03	0,74-5,53	0,167
	Assente	13/56	23,2	-	-	-
Altre patologie	Presente	19/68	27,9	0,74	0,30-1,81	0,505
	Assente	22/69	31,9	-	-	-
PCV2	positive	14/36	38,9	1,02	0,36-2,92	0,966
	negative	27/101	26,7	-	-	-
PRRSV	positive	17/54	31,5	0,53	0,20-1,41	0,203
	negative	24/83	28,9	-	-	-
Tipologia dell'allevamento	ciclo aperto	4/17	23,5	-	-	-
	ciclo chiuso	22/72	30,6	1,77	0,30-10,40	0,525
	ingrasso	5/8 (	62,5	1,19	0,34-4,11	0,787
	centro genetico	8/23	34,8	1,76	0,24-12,99	0,581
	Costante	-		0.05	-	0,003

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, i ceppi identificati, confrontati con ceppi suini ed umani provenienti da USA, Giappone ed Europa, sono risultati tutti appartenere al genotipo 3 e hanno dimostrato di avere, tra loro, un'omologia nucleotidica variabile dall'81,8% al 99,6%.
Pur presentando differenze anche notevoli nella struttura nucleotidica, il profilo amminoacidico non presentava tuttavia variazioni significative e le differenze, quando presenti, non sono state tali da far supporre una variazione a carico della struttura della proteina risultante (fig. 1).

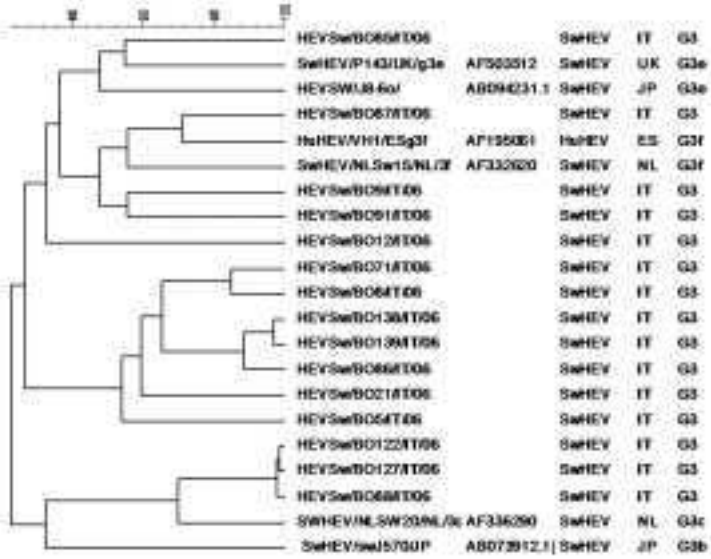


Fig. 1. Risultati dell'analisi filogenetica effettuata sui ceppi identificati con i primers di Huang et al., 2002
Fig. 1. *Dendrogram of HEV human and swine strains identified in Italy (Huang et al., 2002)*

DISCUSSIONE

L'elevata prevalenza riscontrata nel presente lavoro (29,9%), conferma la presenza e la larga diffusione dell'infezione da HEV negli allevamenti suinicoli intensivi del Nord Italia (Caprioli et al., 2007; Di Bartolo et al., 2007) ed è simile a quella riportata in altri paesi europei (Fernandez-Barredo et al., 2006; van der Poel et al., 2001; de Deus et al., 2007).

La maggiore prevalenza riscontrata nei soggetti in magronaggio concorda con quanto già riscontrato in altri lavori ed è verosimilmente da mettere in relazione con il calo dell'immunità materna che può determinare un aumento della probabilità di infezione dei suini appartenenti a questa classe di età (Fernandez-Barredo et al., 2006; Huang et al., 2002; de Deus et al., 2007).

Nei soggetti in magronaggio, il rischio di infezione è risultato essere 3,78 volte superiore rispetto agli animali in svezzamento (tab. 1). Ciò porterebbe ad ipotizzare che, nell'ambito dei soggetti esaminati, gli altri fattori di rischio (tipologia aziendale, presenza di lesioni anatomopatologiche a carico di diversi organi, altre coinfezioni virali) abbiano un ruolo marginale nel determinare un aumento del rischio di infezione. Va tuttavia ricordato che la tipologia di soggetti esaminati è assolutamente peculiare e non confrontabile con quella utilizzata in altri lavori sperimentali (Fernandez-Barredo et al., 2006; Meng et al., 1997; Zheng et al., 2006). Si tratta infatti di soggetti scelti in maniera non casuale tra quelli presenti in allevamento e la cui numerosità non rispecchia le dimensioni aziendali. In altri termini, i soggetti esaminati non possono essere considerati un campione statisticamente rappresentativo dei soggetti presenti nelle

rispettive aziende di provenienza, sia da un punto di vista quantitativo sia da un punto di vista qualitativo (erano infatti soggetti che presentavano evidenti problemi sanitari).
L'osservazione che la presenza di patologie concomitanti a carico di uno o più apparati non era correlata ad una maggiore probabilità di infezione da HEV nei soggetti esaminati, potrebbe confermare l'ipotesi che l'infezione nel suino evolve in modo asintomatico. Tuttavia, in considerazione del particolare tipo di campionamento utilizzato, non è possibile escludere che l'infezione da HEV non sia implicata in patologie multifattoriali o condizionate o non contribuisca ad aggravare altre infezioni, quali ad esempio quelle sostenute da PCV2 o PRRSV.
I risultati del presente lavoro evidenziano che a fronte di una differenza non statisticamente significativa, la prevalenza più elevata è stata tuttavia osservata nei soggetti in cui all'infezione da HEV si associava anche un'altra infezione virale. Va ricordato però che, almeno per quanto riguarda PCV2 la sola identificazione del virus non depone per nessuna patologia in atto.
Dal punto di vista filogenetico, tutti i ceppi identificati sono risultati appartenere al genotipo 3, in accordo con quanto rilevato in Italia, in Europa e in altri Paesi industrializzati (Banks et al., 2004; Caprioli et al., 2007; Clemente-Casares et al., 2003; Di Bartolo et al., 2007; de Deus et al., 2007; Fernandez-Barredo et al., 2006; Van der Poel et al., 2001). Altri studi hanno rilevato che, da un punto di vista filogenetico, i ceppi di HEV di origine umana o di origine suina circolanti in una determinata area geografica appartengono allo stesso genotipo (Banks et al., 2004; van der Poel et al., 2001; Panda et al., 2007).
A fronte di una grande omogeneità di genotipo, tuttavia i ceppi circolanti in una determinata area geografica, possono comunque presentare, tra loro, gradi di omologia variabili (Panda et al., 2007; Lu et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2006). Tale rilievo è confermato anche dai risultati da noi ottenuti sequenziando alcuni dei campioni positivi.
Il grado di omologia nucleotidica tra i ceppi identificati è risultato variabile, sebbene le differenze non risultino presumibilmente in modificazioni della struttura della proteina codificata, osservazione particolarmente importante dato che la regione genomica amplificata è responsabile della codifica della proteina del capside, a sua volta implicata nella risposta immunitaria. L'epidemiologia molecolare dei ceppi sequenziati nei diversi allevamenti ha evidenziato due differenti situazioni: in alcuni casi, ceppi provenienti da allevamenti diversi presentavano gradi di omologia nucleotidica anche molto elevati (99,6%), facendo ipotizzare la circolazione di ceppi di HEV appartenenti ad un unico lineaggio filogenetico. Al contrario, in altri casi, è stato riscontrato che all'interno dello stesso allevamento potevano circolare ceppi anche molto diversi tra loro. L'elevata omologia nucleotidica dei ceppi provenienti da allevamenti diversi potrebbe essere dovuta all'introduzione diretta in più allevamenti dello stesso ceppo, presente anche in altre aziende, mediante la commercializzazione di animali, oppure attraverso contatti indiretti. La presenza di ceppi anche molto diversi tra loro all'interno di un'unica azienda potrebbe essere invece la conseguenza dell'introduzione di suini di diversa origine o l'effetto della pressione selettiva esercitata sul virus da parte dell'immunità di popolazione. Non va tuttavia tralasciata anche la possibilità che l'evidenziazio-

ne di ceppi virali diversi all'interno dello stesso allevamento sia la conseguenza di mutazioni spontanee o di mutazioni indotte dalla pressione selettiva esercitata dall'immunità di popolazione.
Complessivamente, la prevalenza osservata (29,9%) è risultata superiore a quella evidenziata in altri paesi (Huang et al., 2002; Clemente-Casares et al., 2003; Banks et al., 2004). Anche in questo caso, tuttavia, la tipologia di soggetti da noi esaminati non trova riscontri in altri lavori, trattandosi di soggetti con problemi di tipo sanitario.
L'elevata prevalenza riscontrata, insieme al fatto che l'infezione da HEV è verosimilmente sub-clinica nel suino, desta qualche preoccupazione relativamente al rischio di trasmissione zoonosica dell'infezione mediante il contatto con suini infetti, l'ingestione di carne o organi contaminati, la possibilità di contaminazione crociata tra prodotti carnei crudi ed altri alimenti pronti per il consumo ed il rischio di diffusione del virus nell'ambiente con i reflui di allevamento con conseguente possibile contaminazione dei vegetali e delle acque ad uso potabile (Yazaki et al., 2003; Matsuda et al., 2003; Tamada et al., 2003; Tei et al., 2003, Kasorndorkbua et al., 2003). A rischio sarebbero inoltre alcune categorie professionali come allevatori, personale addetto agli animali e veterinari che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione del virus nelle feci. Per tali categorie, non è poi da escludere la possibilità d'infezione per via indiretta attraverso il contatto con strumenti ed attrezzi da lavoro contaminati dalle feci degli animali.
In conclusione, l'ampia diffusione dell'infezione da HEV riscontrata negli allevamenti suini italiani indica la necessità di condurre studi e ricerche che possano meglio chiarire l'impatto dell'infezione sulla salute e produttività degli animali, i fattori di rischio ad essa correlati, il ruolo che il suino può svolgere come serbatoio d'infezione per l'uomo, le possibili implicazioni per la salute pubblica e l'eventuale ruolo patogenetico di HEV nel determinismo di patologie condizionate o a eziologia multifattoriale.

Bibliografia

Arankalle, V. A., L. P. Chobe, and M. S. Chadha. (2006). Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. J Viral Hepat 13:742-5.

Banks, M., G. S. Heath, S. S. Grierson, D. P. King, A. Gresham, R. Girones, F. Widen, and T. J. Harrison. (2004). Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. Vet Rec 154:223-7.

Caprioli, A., F. Martelli, F. Ostanello, I. Di Bartolo, F. M. Ruggeri, L. Del Chiaro, and F. Tolari. 2007. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. Vet Rec 161:422-3

Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. MartIn, S. Bofill-Mas, and R. Girones. (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. Emerg Infect Dis 9:448-54.

de Deus, N., C. Seminati, S. Pina, E. Mateu, M. Martin, and J. Segales. (2007). Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. Vet Microbiol 119:105-14.

Di Bartolo I., Inglese N., Pourshaban M., Martelli F., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2007). Prevalence of hepatitis E virus in Italian pig herds. Preliminary results. Proc. of 7th

International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, Italy, May 9-11, 2007, 207-210.

Drobeniuc, J., M. O. Favorov, C. N. Shapiro, B. P. Bell, E. E. Mast, A. Dadu, D. Culver, P. Iarovoi, B. H. Robertson, and H. S. Margolis. (2001). Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. J Infect Dis 184:1594-7.

Emerson, S. U. and R. H. Purcell. (2003). Hepatitis E virus. Rev Med Virol 13:145-54.

Erker, J. C., S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. (1999). Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. J Virol Methods 81:109-13.

Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, S. Vega, M. T. Gomez, and M. T. Perez-Gracia. (2006). Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 18:462-5.

Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. T. Liu, A. W. Tam, D. Y. Lin, and Y. F. Liaw. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. J Clin Microbiol 37:3828-34.

Huang, F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng. (2002). Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. J Clin Microbiol 40:1326-32.

Kasorndorkbua, C., B. J. Thacker, P. G. Halbur, D. K. Guenette, R. M. Buitenwerf, R. L. Royer, and X. J. Meng. (2003). Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. Can J Vet Res 67:303-6.

Lee, S. H., S. C. Kang, D. Y. Kim, J. H. Bae, and J. H. Kim. (2007). Detection of swine hepatitis E virus in the porcine hepatic lesion in Jeju Island. J Vet Sci 8:51-5.

Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol 16:5-36.

Martin, M., J. Segales, F. F. Huang, D. K. Guenette, E. Mateu, N. de Deus, and X. J. Meng. (2007). Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. Vet Microbiol 122:16-24.

Matsuda, H., K. Okada, K. Takahashi, and S. Mishiro. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. J Infect Dis 188:944.

Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. J Virol 72:9714-21.

Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci U S A 94:9860-5.

Meng, X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. J Clin Microbiol 40:117-22.

Panda, S. K., D. Thakral, and S. Rehman. (2007). Hepatitis E virus. Rev Med Virol 17:151-80.

Siochu , Froesner , Tassis , Kyriakis , Alexopulos , and Kyriakis (2004). First report of the prevalence of anti-hepatitis E virus (anti-HEV) IgG in blood serum of blood donors, slaughtermen and swine farmers in Greece. Proceedings 18th International Pig Veternary Society (IPVS) congress 1, 367.

Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsuhashi, O. Inoue, F. Mawatari, and H. Ishibashi. 2004. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. J Hepatol 40:869-70.

Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet 362:371-3.
van der Poel, W. H., F. Verschoor, R. van der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo, M. Kooreman, and A. M. de Roda Husman. (2001). Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. Emerg Infect Dis 7:970-6.
Withers, M. R., M. T. Correa, M. Morrow, M. E. Stebbins, J. Seriwatana, W. D. Webster, M. B. Boak, and D. W. Vaughn. (2002). Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. Am J Trop Med Hyg 66:384-8.
Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda, and H. Okamoto. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. J Gen Virol 84:2351-7.
Zheng, Y., S. Ge, J. Zhang, Q. Guo, M. H. Ng, F. Wang, N. Xia, and Q. Jiang. (2006). Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. J Infect Dis 193:1643-9.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI DUE DIVERSI PROGRAMMI TERAPEUTICI DI MEDICAZIONE NEL MANGIME SULL'ATTRITION COME CONSEGUENZA DELLA MALATTIA RESPIRATORIA IN SVEZZAMENTO

EVALUATION OF TWO DIFFERENT IN FEED MEDICATION THERAPEUTIC PROGRAMS ON ATTRITION AS A CONSEQUENCE OF SWINE RESPIRATORY DISEASE IN NURSERY

PAOLO FERRO[1], FRANCESCO TONON[2], PAOLO BONILAURI[3]
[1]Elanco AH div. di Ely Lilly Italia – Sesto Fiorentino - FI; [2]Medico Veterinario, San Vendemmiano (TV); [3]IZS Lombardia ed Emilia Romagna sezione di Reggio Emilia

Parole chiave: Attrition, Malattia Respiratoria Suina, Suini di Pieno Valore™
Key words: Attrition, Swine Respiratory Disease, Full Value Pigs™

Riassunto. Dopo diagnosi da parte del veterinario aziendale di malattia respiratoria nel settore svezzamento dell'allevamento oggetto dello studio, due gruppi di 110 suini / cad. (Gruppo Pulmotil™ e Gruppo Controllo) sono stati trattati con due diversi programmi terapeutici di medicazione del mangime per i primi 21 giorni successivi allo svezzamento. E' stato poi valutato, dallo svezzamento fino alla macellazione, l'impatto dei due diversi trattamenti sull'Attrition (scarti, morti e sottopeso). Sono stati registrati i dati relativi a scarti e morti, tutti i suini sono stati pesati individualmente a 3 e a 10 settimane di vita, a 20 settimane sono stati pesati singolarmente il 25-30% dei suini di entrambi i gruppi e infine sono stati registrati i pesi della carcassa di ciascun suino in sede di macellazione. I suini del gruppo Pulmotil™ hanno fatto registrare pesi medi migliori a 10 e a 20 settimane d'età, così come i pesi medi delle carcasse dei soggetti del Gruppo Pulmotil™ erano più elevati rispetto al gruppo controllo. Gli autori concludono rilevando come, in questo studio, l'utilizzo di Pulmotil™ abbia migliorato lo stato sanitario, con migliori performance dallo svezzamento alla macellazione e produzione di una maggiore percentuale di Suini di Pieno Valore™.

Abstract. After diagnosis of respiratory disease in the nursery sector of the farm where the study was performed, two groups of 110 pigs per group (Pulmotil™ Group and Control Group) were treated with two different in feed medication therapeutic programs for the first 21 days after the weaning. The impact of the two different treatments on Attrition (culls, deaths and lightweights) was evaluated from weaning to the market place. The data about culls and deaths were recorded, all the pigs were individually weighted at 3 and 10 weeks of age, around 25-30 % of each group was weighted at 20 weeks of age, then the individual carcass weight was collected. Pulmotil™ Group showed mean weights higher than Control Group at 10 and 20 weeks of age, and also the mean carcass weights was higher in the Pulmotil™ Group than in the Control Group. In conclusion the authors point out as the use of Pulmotil™, in this study, increased animal health, with better performances from weaning to the market place and produced more Full Value Pigs™.

Introduzione

Studi precedenti hanno indicato come l'Attrition (Scarti, Morti e Sottopeso) abbia un impatto importante sulla profittabilità degli allevamenti[1], dovuto alla diminuzione degli animali che arrivano al macello come Suini di Pieno Valore™. E' stato infatti stimato che mediamente in un allevamento la percentuale di suini che non raggiungono il loro pieno valore perché scarti, morti o sottopeso riguardi il 30-35% dei nati vivi[1].
Altri studi hanno dimostrato che le malattie sono la principale causa di Attrition[2], che la prevalenza iniziale di patogeni ha un ruolo fondamentale nella gravità delle malattie[3] e che interventi precoci possono ridurre questa prevalenza[3]. Scopo del presente studio è stata la valutazione dell'efficacia di un trattamento con Pulmotil™ nella riduzione del danno dovuto a malattia respiratoria, utilizzando come indicatore l'Attrition in alternativa agli score clinici.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto in un allevamento situato nel Nord-Est dell'Italia da Marzo a Dicembre 2007. Dopo diagnosi da parte del veterinario aziendale di malattia respiratoria nel settore svezzamento, sono stati sottoposti alla prova 220 suini. Questi sono stati suddivisi in due gruppi di 110 suini per gruppo e trattati con due diversi programmi di medicazione nel mangime per i primi 21 giorni successivi allo svezzamento:
– Gruppo Pulmotil™: tilmicosina (Pulmotil™) 400 ppm,
– Gruppo Controllo: sulfadimetossina 2000 ppm e clortetraciclina 800 ppm (Polisulfan™).
Tutti i suini sono stati individuati con marca auricolare numerata allo svezzamento (3 settimane d'età). Ogni suino è stato poi pesato individualmente a 3 e a 10 settimane (uscita dal settore svezzamento) d'età. A 20 settimane d'età sono stati pesati singolarmente il 25-30% degli animali di ciascun gruppo, infine sono stati registrati i pesi singoli delle carcasse in sede di macellazione. Sono stati inoltre registrati i dati relativi alla mortalità e ai suini usciti come scarti.
Analisi statistica: sono stati confrontati i pesi medi dei gruppi con analisi ANOVA a una via quando il test di Barlett dimostrava l'omogeneità della varianza e con test di Kruskal-Wallis quando l'omogeneità della varianza non era dimostrata, utilizzando il software Intercooled Stata 7.0. Il valore di $p<0.05$ è stato assunto come livello di significatività e $p<0.1$ è stato considerato come tendenza statistica.

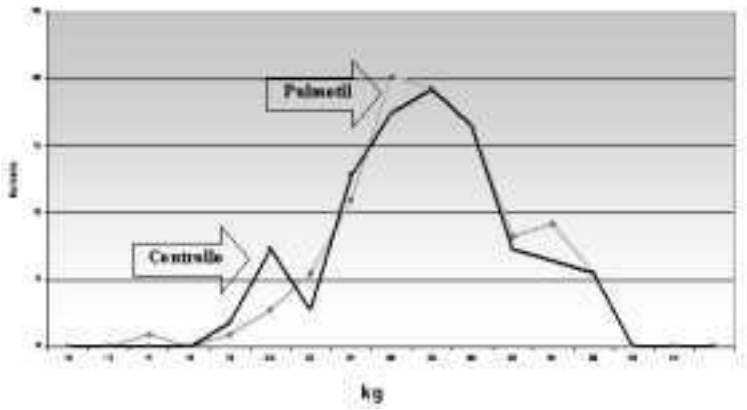
Risultati

La percentuale totale (dallo svezzamento alla macellazione) di morti e scarti è risultata essere maggiore nel Gruppo Controllo (8.18%) rispetto al Gruppo Pulmotil (6.36%).
I risultati relativi alle performance dei pesi sono riportati in tabella 1 e schematizzati nei grafici 1, 2 e 3.

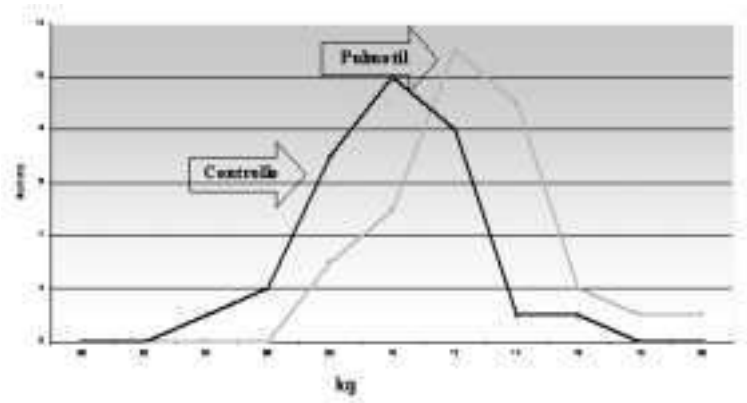
Tab. 1. Pesi medi (kg) a 3, 10 e 20 settimane d'età e pesi medi delle carcasse (kg).
Tab. 1. *Average weight (kg) at 3, 10 and 20 weeks of age and average carcass weight (kg).*

Età	Pulmotil™	Controllo
3 settimane	6.41 [CI_{95} 6.24-6.58] (n=110)	6.38 [CI_{95} 6.20-6.55] (n=108)
10 settimane	27.29 [CI_{95} 26.5-28.1] (n=109)	26.84 [CI_{95} 26.0-27.7] (n=105)
20 settimane	73.13* [CI_{95} 72.2-74.0] (n=32)	70.52 [CI_{95} 69.6-71.4] (n=30)
Peso carcasse	145.11*^{t} [CI_{95} 143.0 -147.1] (n=103)	143.06 [141.4-144.8] (n=99)

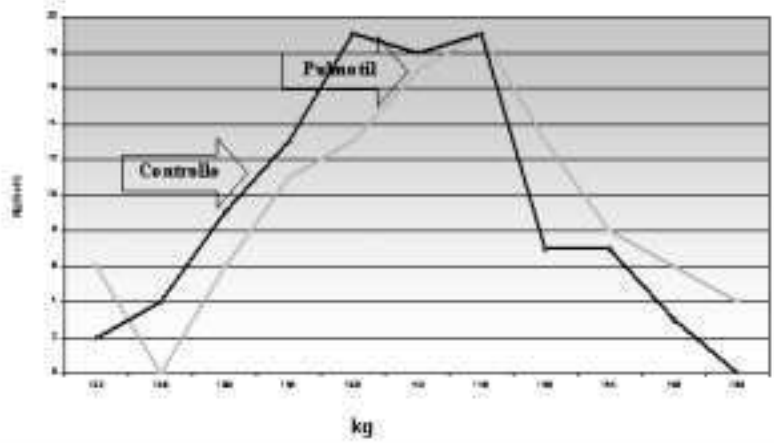
$p<0.01$; *^{t} $p<0.1$.



Graf. 1. Distribuzione dei pesi a 10 settimane d'eta.
Grap. 1. *Weight distribution at 10 weeks of age.*



Graf. 2. Distribuzione dei pesi a 20 settimane d'età.
Grap. 2. *Weight distribution at 20 weeks of age.*



Graf. 3. Distribuzione dei pesi delle carcasse.
Grap. 3. *Carcass weight distribution.*

Il Gruppo Pulmotil™ a 10 settimane d'età ha fatto registrare pesi medi maggiori rispetto al Gruppo Controllo (27.29 kg vs 26.84 kg) senza differenze statisticamente significative.
A 20 settimane il peso medio degli animali pesati è risultato maggiore con significatività statistica (Anova test $F_{1,60}$ $p<0.01$) nel Gruppo Pulmotil™ rispetto al Gruppo Controllo (73.13 kg vs 70.52 kg).
Infine, il peso medio delle carcasse dei suini del Gruppo Pulmotil™ è risultato più elevato (145.11 kg vs 143.06 kg) rispetto al Gruppo Controllo con tendenza statistica a sviluppare pesi maggiori (Kruskal-Wallis test $Chi^2_{(1)} = 2.841$ $p=0.09$).

Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente studio confermano l'efficacia di Pulmotil™ nel miglioramento dello stato sanitario degli animali trattati, con migliori performance di accrescimento dallo svezzamento fino alla macellazione e produzione di una maggiore percentuale di Suini di Pieno Valore™.

Bibliografia

Deen, J., 2005. Pro Forma budgets and the at risk pig. AASV proceedings, 441-443,
Deen, J., 2002. Disease and slow growth and mortality in pigs. *International Pigletter*, 23,
Keffaber et al., 2006. The impact of Pulmotil feeding in the nursery on finishing performance of at-risk pigs. AASV proceedings, 127-130.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UN PROGRAMMA DI MEDICAZIONE CON TILOSINA E SULFAMETAZINA (TYLAN®SULFA G100 PREMIX) NEL MANGIME DELLE SCROFE DURANTE I PERIODI PRE PARTO E LATTAZIONE

FIELD TRIAL TO EVALUATE THE EFFICACY OF A FEED MEDICATION PROGRAM FOR SOWS WITH TYLOSIN AND SULPHAMETAZIN (TYLAN®SULFA G100 PREMIX) DURING PRE-FARROW AND LACTATION PERIODS

SARA ROTA NODARI[1], PAOLO CANDOTTI[2], CLAUDIA NASSUATO[2], PAOLO FERRO[3]

[1]ASL Brescia, DMV1, P.le Repubblica 2, Brescia; [2]Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia; [3]Elanco Animal Health div. di Ely Lilly Italia – Sesto Fiorentino – FI

Parole chiave: tilosina, sulfametazina, scrofa, lattazione
Key words: tylosin, sulphametazin, sow, lactation

Riassunto. La prova sperimentale è stata condotta in un allevamento a bande a ciclo aperto di 130 scrofe con problemi di rinite nei suini mandati all'ingrasso. Nello studio sono state incluse 6 bande consecutive che sono state assegnate alternativamente al gruppo di controllo (n=100) o a quello di trattamento (n=101). Il trattamento consisteva nella somministrazione di mangime medicato con Tylan Sulfa G100 Premix® (100 gr/q) da 7 giorni prima del parto e per tutta la durata della lattazione. Il trattamento in profilassi delle scrofe con Tylan Sulfa G100 Premix® è stato in grado di determinare effetti positivi nella nidiata sia in termini di numero di suinetti svezzati (10,43 *vs* 9,87) che di peso allo svezzamento (7,89 *vs* 7,29). Il trattamento ha dimostrato effetti positivi anche sulle scrofe, diminuendo il costo dei trattamenti sanitari extra, ma soprattutto determinando un aumento dei suinetti nati vivi al parto successivo, che è risultato pari a 9,8 suinetti nel gruppo trattato rispetto a 8,8 nel gruppo controllo.

Abstract. The study was performed in a farrow to weaning farm with 130 sows managed by a batch farrowing system in Northern Italy, with signs of rhinitis in a few fat pigs. The study included 6 consecutive groups of sows alternately assigned to either the control group (n=100) or the treatment group (n=101). During the 7 days preceding farrowing and throughout the lactation period (27 days), the sows of the treatment group (n=101) were given feed medication with 100 g/100 kg Tylan® Sulfa G100 Premix. The prophylactic treatment of the sows with Tylan® Sulfa G100 Premix resulted positive effects on the litter, in terms of both the number of weaned piglets (10,43 vs 9,87) and weight at weaning (7,89 kg vs 7,29 kg). Treatment produced also positive effects on the sows, making it possible to cut the costs of additional health treatment and, above all, showing an increase in the number of piglets born alive at the next delivery , that is 9,8 in the treatment group and 8,8 in the control group.

Introduzione ed obiettivi

Alcune prove sperimentali (T1XPSP0602P4-GPP70/06, T5C370512) hanno evidenziato che il trattamento *per os* delle scrofe con tilosina e sulfametazina è in grado di incrementare i parametri sanitari e zootecnici dei riproduttori, diminuire la trasmissione dei patogeni ai suinetti e migliorare lo sviluppo immunitario dei suinetti.
L'obiettivo della prova era quello di valutare l'effetto del trattamento delle scrofe con Tylan® Sulfa G100 Premix (tilosina 100ppm + sulfaditidina 100ppm), sui parametri zootecnici delle loro nidiate e sulla portata al parto successivo.

Materiali e metodi

La prova sperimentale è stata effettuata in un allevamento a ciclo aperto di 130 scrofe situato nel Nord Italia con conduzione a bande di 5 settimane, dove nei suini mandati all'ingrasso erano stati identificati problemi di rinite attraverso esami di laboratorio. Nello studio sono state incluse 6 bande consecutive omogenee di circa 33 scrofe ciascuna che sono state assegnate alternativamente al gruppo di trattamento o a quello di controllo. Le scrofe (n=101) del gruppo trattamento hanno ricevuto nei 7 giorni prima del parto e per tutta la durata della lattazione (27 giorni) alimento medicato con 100 gr/q di Tylan®Sulfa G100 Premix. Le scrofe controllo (n=100) hanno ricevuto il medesimo alimento delle scrofe trattate ma senza medicazione. I parametri zootecnici delle nidiate sono stati valutati nell'intervallo nascita-svezzamento.

Analisi statistica

L'analisi delle variabili numero di nati vivi (BA), di nati morti, di mummificati, di feti decomposti, di scarti morti, di schiacciati, di morti durante la lattazione, è stata condotta adattando ai dati dei modelli di regressione di Poisson. Ove si sia rilevata una violazione delle assunzioni del modello o una situazione di sovradispersione (varianza > della media) si è adottata la distribuzione binomiale negativa come distribuzione dei residui. La verifica della bontà di adattamento ai dati è stata effettuata mediante test chi quadrato di Pearson. L'analisi del peso complessivo della nidiata è stata effettuata adattando ai dati un modello di regressione lineare previa verifica degli assunti di normalità dei residui e di omoscedasticità. L'analisi dei costi dei trattamenti medicamentosi extra è stata effettuata mediante un modello di regressione logistica, previa dicotomizzazione della variabile in assenza/presenza di costo aggiuntivo. Ai fini della inclusione delle variabili nei modelli è stato adottato un livello di significatività pari a 0.20. Tuttavia nel modello si sono mantenute variabili non significative nel caso in cui si reputassero rilevanti da un punto di vista biologico. Il modello finale è stato ottenuto con procedura stepwise. Il livello di significatività adottato è 0.05.

Risultati

Al momento del parto le condizioni delle nidiate erano omogenee nel gruppo trattato e

in quello di controllo che non mostravano differenze statisticamente significative nel numero medio di suinetti nati vivi (12.16, range IQ 10-14), nel peso medio della nidiata al parto (17.73 kg, DS: 3.89), nel numero medio di suinetti nati morti (0.9, range IQ: 0-1), mummificati (0.14, range IQ: 0-0) e macerati (0.13, range IQ: 0-0).
La distribuzione percentile ed il valore medio del peso totale delle nidiate a fine parto, suddivisa per gruppo di trattamento, è riportata in tabella 1.

Tab. 1. Distribuzione percentile e valore medio del peso totale delle nidiate (kg) a fine parto per gruppo di trattamento.
Tab. 1. *Percentile distribution and average litter weight (kg) at the end of the farrow according to treatment group.*

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
Controllo	8.1	14.78	17.8	17.49	20.72	26.3
Trattati	8.2	15.80	17.8	17.96	20.40	28.2

La distribuzione percentile ed il valore medio del numero totale di suinetti svezzati per gruppo di trattamento è riportato in tabella 2.

Tab. 2. Distribuzione percentile e valore medio del numero totale di suinetti svezzati per gruppo di trattamento.
Tab. 2. *Percentile distribution and average number of total weaned piglets according to treatment group.*

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
Controllo	0	9	10	9.87	11	13
Trattati	0	10	11	10.43	12	15

In tabella 3 è presentata una sintesi dei risultati suddivisa per gruppo di trattamento.

Tab.3. Risultati suddivisi per gruppo di trattamento.
Tab. 3. *Results divided according to treatment group.*

	Controllo	Trattati
N° scrofe trattate	100	101
N° suinetti nati vivi	1217	1228
N° suinetti schiacciati	**114**	**81***
N° scarti morti	**90**	**54***
N° scrofe con suinetti scarti morti	46	34
N° suinetti morti in lattazione	**230**	**175***
N° suinetti svezzati/scrofa	9,87	10,43
Peso medio suinetti a fine lattazione	7,29 kg	7,89 kg
Costi trattamenti extra/scrofa gruppo	1,74 €	0,93 €
Suinetti nati vivi al parto successivo/scrofa	8,8	9,8

*= $p<0,05$

Discussione e Conclusioni

Il trattamento in profilassi delle scrofe con Tylan Sulfa G100 Premix® è stato in grado di determinare effetti positivi nella nidiata sia in termini di numero di suinetti svezzati che di peso allo svezzamento. In particolare, il trattamento ha determinato effetti positivi sul numero si suinetti schiacciati, sul numero di suinetti scarti e sul numero di suinetti morti in lattazione.
Il trattamento ha dimostrato effetti positivi anche sulle scrofe, diminuendo il costo dei trattamenti sanitari extra, ma soprattutto determinando un aumento dei suinetti nati vivi al parto successivo, che è risultato pari a 9,8 suinetti nel gruppo trattato, rispetto a 8,8 nel gruppo controllo.

Bibliografia

Bane D (1999). Effect of Tylan at 100g/Ton during lactation on fecal sedding of Lawsonia intracellularis by sows. T1XS29703 / T1XS29704,
Elanco data on file: T1XPSP0602P4 - GPP 70/06,
Elanco data on file: T5C370512.

VALUTAZIONE DELLA MORTALITÀ SOTTOSCROFA CAUSATA DA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* PRIMA E DOPO LA SOMMINISTRAZIONE DI TILOSINA TARTRATO (TYLAN® SOLUBILE) AI SUINETTI ALLA NASCITA

EVALUATION OF PIGLETS MORTALITY CAUSED BY CLOSTRIDIUM PERFRINGENS DURING LACTATION PERIOD, BEFORE AND AFTER A TREATMENT WITH TYLOSIN TARTRATE (TYLAN® SOLUBLE) AT THE BIRTH

FRANCESCO SALVINI[1], PAOLO FERRO[2]
[1]Medico Veterinario, Brescia; [2]Elanco Animal Health div. di Ely Lilly Italia – Sesto Fiorentino – Firenza

Parole chiave: *Clostridium perfringens*, enterite, tilosina
Key Words: *Clostridium perfringens*, enteritis, tylosin

Riassunto. In due scrofaie (siti 1) comparivano nei suinetti in lattazione gravi problemi riferibili a patologia enterica causata da *Clostridium perfringens*. La diagnosi di clostridiosi venne fatta su base anatomo patologica e dopo isolamento microbiologico del germe e reperimento delle tossine alfa e beta 2 tramite PCR. La diarrea era refrattaria a diversi trattamenti antibiotici. Per un periodo di sei mesi i suinetti dei due allevamenti oggetto dello studio furono trattati, il giorno della nascita, con 30 mg di Tylan® Solubile somministrato per via orale. In uno dei due allevamenti venne somministrato anche Neo-Tylan® G250 Premix nel mangime delle scrofe gestanti, al dosaggio di 40 gr/ql di mangime (100 ppm di tilosina). La mortalità sottoscrofa (dalla nascita allo svezzamento) rilevata nei sei mesi successivi l'inizio della prova venne confrontata con la mortalità relativa ai sei mesi precedenti. In entrambi gli allevamenti, l'uso di Tylan® Solubile nei suinetti al dosaggio di 30 mg / kg pv ed in un caso anche di NeoTylan® G250 Premix nel mangime scrofe gestanti determinò un'importante riduzione della mortalità sul totale del numero dei morti. Inoltre, la maggior vitalità dei suinetti, portò ad una riduzione del numero di animali schiacciati sottoscrofa, così come ad un minor numero di soggetti morti dopo il 7° giorno di vita. Nell'allevamento in cui venne utilizzato anche Neo-Tylan® G250 nelle scrofe gestanti ci fu un ulteriore sensibile miglioramento della problematica enterica nei suinetti.

Abstract. On two farrow farms (site 1) the piglets, during the lactation period, had serious enteritis symptoms caused by *Clostridium perfringens*. The diagnosis of clostridial enteritis was discovered by autopsy and after the microbiological isolation of the bacterium and the detection of α and β 2 toxins by PCR. Diarrhea was resistant at different treatments. For six months all the piglets were treated at the birth with 30 mg of Tylan® Soluble orally. In one of two farms the sows were also treated by medication of the gestation feed with 40 gr / 100 kg feed (100 ppm) of NeoTylan® G250 Premix. The mortality rate during lactation (from the birth to weaning) was recorded during the following six months from the beginning of the trial and was compared with

the mortality rate of the previous six months. In both the farms the use of Tylan® Soluble in the piglets at a dosage of 30 mg / kg b.w. and in one of the two farms also the medication of gestating feed, 40gr / 100 kg of NeoTylan® G250 Premix, had caused a great decrease in the piglet mortality. Furthermore, the better piglet vitality caused a lower number of crushed piglets and a low number of deaths after 7 days of age. On the farm where NeoTylan® G250 Premix was also used in the gestating sow there was a further reduction of the enteritis in the piglets.

INTRODUZIONE

I Clostridi sono batteri Gram +, anaerobi, in grado di formare spore e di sopravvivere nell'ambiente per lunghissimi periodi. In genere le patologie causate da Clostridi derivano dall'azione delle tossine che questi producono. Tra le varie specie di Clostridi patogeni per il suino la più importante è sicuramente il *Clostridium perfringens*. Questo, in base alla produzione delle principali tossine letali, è suddiviso in 5 tipi identificati con le lettere A, B, C, D ed E.
Il suino può essere colpito dai tipi A e C. La manifestazione clinica della patologia consiste in un'enterite necrotico - emorragica che colpisce i suinetti in genere entro i primi 4 giorni di vita. La trasmissione avviene da suinetto a suinetto per contatto orofecale e l'origine può essere data dalla presenza del germe nelle feci della scrofa o nell'ambiente. L'azione patogena è determinata principalmente dalla produzione della β-tossina che causa la necrosi delle componenti strutturali dei villi intestinali. La manifestazione clinica può essere iperacuta (morte improvvisa poche ore dopo la nascita e regione perianale sporca di sangue), acuta (morte dopo 1-2 giorni dalla nascita con diarrea sanguinolenta) e sub-acuta (diarrea liquida giallo verdastra in suinetti emaciati, foto 1).

Fig. 1. Clostridiosi: diarrea liquida giallo verdastra in suinetti emaciati.
Fig. 1. *Clostridiosis: Emaciated piglets with liquid yellow greenish diarrhea.*

Le lesioni si manifestano nel piccolo intestino che si presenta rosso-scuro ed emorragico (foto 2). Nei casi con decorso tra i 3 e i 5 giorni può esserci la presenza di enfisema a livello della parete intestinale, dovuto alla replicazione del batterio.

Fig. 2. Lesioni enteriche causate da *Clostridium perfringens*
Fig. 2. *Enteric lesions caused by* Clostridium perfringens

La diagnosi avviene solitamente su base necroscopica che necessita però della conferma del laboratorio.
Il trattamento su base antibiotica risulta efficace solo se effettuato nei primissimi periodi di vita del suinetto, prima che ci sia stata la produzione di tossine da parte del batterio.
E' stata dimostrata l'azione della tilosina verso *Clostridium perfringens* nel pollo (C.T Collier et al., 2003). Per altri antibiotici quali le β-lattamine è descritta una certa efficacia (M. White, 2007).
Obiettivo dello studio è stato valutare l'efficacia di un trattamento con Tylan® Solubile nel controllo dell'enterite da *Clostridium perfringens* e confrontare la mortalità sottoscrofa prima e dopo l'utilizzo di tale trattamento. Il prodotto è stato somministrato individualmente ad ogni suinetto il giorno della nascita al dosaggio di 30mg/kg peso vivo di tilosina, e, in uno dei due allevamenti oggetto dello studio, il mangime gestazione delle scrofe è stato medicato con 40 gr/qle (100 ppm di tilosina) di Neo-Tylan® G250.

MATERIALI E METODI

Lo studio si è svolto in 2 scrofaie con gravi problemi riferibili a patologia enterica causata soprattutto da *Clostridium perfringens*.
Gli allevamenti in questione sono dei siti 1 con conduzione in bande settimanali e svezzamento tra i 21 e i 25 giorni di età.

Le dimensioni dei 2 allevamenti sono rispettivamente di 700 (Allevamento A) e 1200 (Allevamento B) scrofe circa.
Entrambe le aziende hanno rimonta interna, e l'allevamento A ha un accrescimento scrofette da 60 a 100kg in capanne all'aperto con parchetto in terra.
La diagnosi eziologica è stata fatta sia in base alle lesioni anatomo patologiche sia tramite l'isolamento del patogeno da intestino di 18 suinetti appositamente sacrificati durante due visite aziendali ed inviati al laboratorio entro 12 ore. Dal contenuto intestinale sono state eseguite le tradizionali indagini colturali per l'isolamento di *E.coli, Salmonella sp*. e *Clostridium sp*.. Sono stati prelevati campioni utilizzati per l'esame parassitologico e virologico effettuato mediante Microscopia Elettronica e PCR. I patogeni isolati sono stati identificati e tipizzati mediante prove biochimiche, sierologiche, PCR previste nei protocolli diagnostici routinari. Per quanto riguarda *Clostridium perfringens* è stata eseguita un'identificazione dei ceppi mediante PCR dei geni produttori di tossine ed un'indagine quantitativa che ha permesso di determinare la carica batterica espressa come UFC/gr di contenuto intestinale.
In entrambi gli allevamenti le sole scrofette venivano vaccinate per E. Coli a 60 e 80 giorni di gestazione.
Per un periodo di sei mesi i suinetti dei due allevamenti oggetto dello studio sono stati trattati, il giorno della nascita, con 30 mg di Tylan® Solubile somministrato per via orale. Per ottenere un tale dosaggio 3 grammi di prodotto venivano sciolti in 100 ml di acqua in contenitori con dosatore, tale da permettere la somministrazione di 1 ml/capo della soluzione ottenuta. Nell'allevamento A, vista la gravità della sintomatologia, è anche stato somministrato Neo-Tylan® G250 nel mangime delle scrofe gestanti, al dosaggio di 40 gr/ql di mangime (100 ppm di tilosina).
La mortalità sottoscrofa (dalla nascita allo svezzamento) registrata tramite l'utilizzo dello stesso software aziendale nei due allevamenti oggetto dello studio nei sei mesi successivi l'inizio della prova è stata confrontata con la mortalità relativa ai sei mesi precedenti.

RISULTATI

L'esame batteriologico ha permesso di mettere in evidenza in 12 soggetti la presenza di *Clostridium perfringens* ad una concentrazione superiore a $2\ 10^7$ UFC/g. La genotipizzazione degli stessi ceppi di *Clostridium perfringens* ha permesso di identificare la presenza di geni specifici per la produzione di tossine alfa e beta 2. Durante il percorso diagnostico, è stato più volte isolato anche *Escherichia coli* ei test di sensibilità hanno messo in evidenza una sensibilità ai differenti antibatterici variabile nel tempo e comunque con risposte terapeutiche assolutamente insufficienti.
Le ricerche per *Salmonella sp*., l'esame parassitologico e le indagini virologiche hanno dato sempre esito negativo.
I dati riferibili alla mortalità, sono stati suddivisi per classe di parto ed età del decesso prima e dopo il trattamento con Tylan® Solubile.
Nelle tabelle seguenti sono riportati alcuni dati, indicanti le variazioni di mortalità nei due periodi.

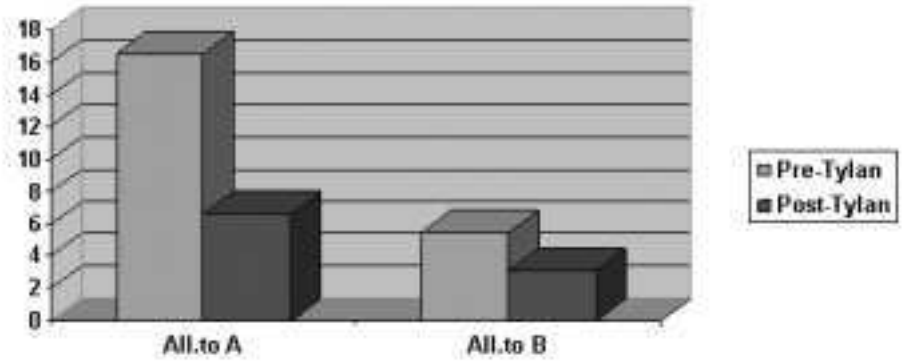
Come si può notare dalla tabella 1, la diminuzione percentuale delle perdite attribuibili a forma enterica è stata assolutamente evidente sia nell'allevamento A che nel B. Sul totale dei morti sottoscrofa, la riduzione percentuale di suinetti morti per diarrea è stata del 60% nell'allevamento A e del 42,2% nell'allevamento B (tabella 2 e grafico 1).

Tab. 1. Mortalità totale (%) e per forma enterica (%) pre e post trattamento.
Tab. 1. *Total mortality (%) and mortality for enteritis (%) before and after the treatment.*

MORTALITÀ NATI VIVI-SVEZZATI	TOTALE		DIARREA	
	Pre-trattamento	Post-trattamento	Pre-trattamento	Post-trattamento
ALLEVAMENTO A	12,47 %	11,62%	2,06 %	0,76 %
ALLEVAMENTO B	9,40%	9,09 %	0,51 %	0,28 %

Tab. 2. Mortalità per diarrea (%) sul totale dei morti pre e post trattamento.
Tab. 2. *Mortality for diarrhea (%) on the total piglet mortality before and after the treatment.*

	PRE TRATTAMENTO	POST TRATTAMENTO
ALLEVAMENTO A	16,5%	6,6% => -60%
ALLEVAMENTO B	5,4 %	3,1 % => -42%

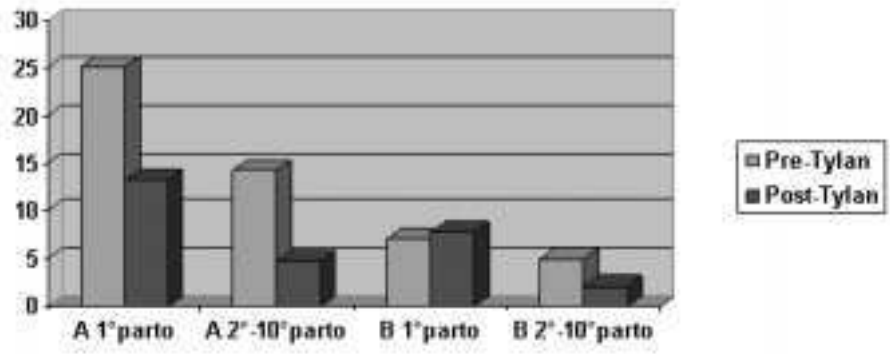


Graf. 1. Mortalità per diarrea (%) sul totale dei morti pre e post trattamento.
Grap. 1. *Mortality for diarrhea (%) on the total piglet mortality before and after the treatment.*

Soprattutto nell'allevamento A, il numero dei morti era sensibilmente più elevato nelle scrofe di primo parto rispetto al resto della mandria, ed il trattamento con Tylan® Solubile ha evidenziato un netto miglioramento in termini di mortalità sulle scrofe primipare dell'allevamento A e sulle scrofe tra il 2° e il 10° parto di entrambi gli allevamenti (tabella 3 e grafico 2).
La netta riduzione in termini di sintomatologia enterica, ha giovato anche sul numero dei suinetti schiacciati (tabella 4).

Tab. 3. Mortalità per diarrea (%) in base al numero di parti pre e post trattamento sul totale dei morti (%).
Tab. 3. *Mortality for diarrhea (%) based on the farrow number before and after the treatment on the total piglet mortality (%).*

	TOTALE		1° PARTO		2°-10° PARTO	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
ALLEVAMENTO A	16,5	6,6 -60%	25,1	13,2 - 47,4%	14,3	4,7 -67,1%
ALLEVAMENTO B	5,4	3,1 -42%	7,1	7,8 + 8,9%	5	2,1 -58%



Graf. 2. Mortalità per diarrea (%) in base al numero di parti pre e post trattamento sul totale dei morti (%).
Grap. 2. *Mortality for diarrhea (%) based on the farrow number before and after the treatment on the total piglet mortality (%).*

Tab. 4. Mortalità per schiacciamento (%) pre e post trattamento sul totale dei morti (%).
Tab. 4. *Crushed piglets (%) before and after the treatment on the total mortality (%).*

	TOTALE		1° PARTO		2°-10° PARTO	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
ALLEVAMENTO A	52,3	48,6 -7,1%	46	32,5 - 29,3%	54	53,3 -1,3%
ALLEVAMENTO B	47	46,9 -0,2%	43,1	40,2 - 6,7%	48,1	48,4 +0,6%

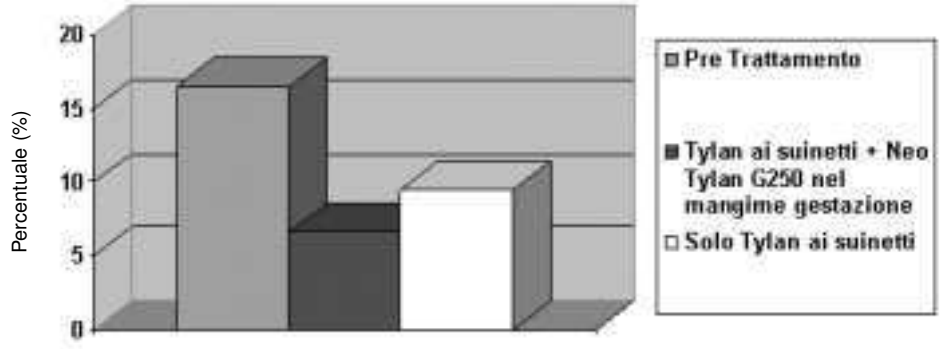
Per quanto riguarda la mortalità in correlazione ai giorni di vita dei suinetti, dopo il trattamento in entrambi gli allevamenti c'è stato un minor numero di soggetti morti dopo il 7° giorno di vita.
Un' ultima valutazione circa l'efficacia di Tylan® Solubile nel controllo delle clostridiosi, è stata fatta nell'allevamento A, in cui per la durata di 30 giorni, è stata tolta l'aggiunta di tilosina nel mangime delle scrofe gestanti, e mantenuta invece la somministrazione di Tylan® Solubile per via orale nei suinetti. Il risultato, esposto in tabella 6 e grafico 3, evidenzia un aumento di circa 3 punti percentuali di mortalità, nel periodo in cui è stata tolta la medicazione nel mangime delle scrofe gestanti.

Tab. 5. Mortalità per diarrea (%) pre e post trattamento in base ai giorni di vita dei suinetti.
Tab. 5. *Mortality for diarrhea (%) before and after the treatment based on the piglets age (days).*

	0-1 giorno		2-3 giorni		4-7 giorni		8-14 giorni	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
ALLEVAMENTO A	9,6	12	61	74,7	25	13,3	4,4	0
ALLEVAMENTO B	2,9	1,6	17,4	5	34,8	60	45	33

Tab. 6. Mortalità per diarrea (%) nell' allevamento A: pre trattamento, con l'uso di Tylan® Solubile nei suinetti e di Neo Tylan® G250 nel mangime gestazione e senza Neo Tylan G250 nel mangime gestazione.
Tab. 6. *Mortality for diarrhea (%) in the farm A: pre treatment, by the use of Tylan® Soluble in the piglets and Neo Tylan® G250 in the gestating feed and without Neo Tylan G250 in the gestating feed.*

	PRE TRATTAMENTO	POST TRATTAMENTO
CON TYLAN AI SUINETTI E NEO TYLAN G250 ALLE SCROFE GESTAZIONE	16,5%	6,6%
SENZA NEO TYLAN G250 NEL MANGIME GESTAZIONE	9,5%	



Graf. 3. Mortalità per diarrea (%) nell'allevamento A: pre trattamento, con l'uso di Tylan® Solubile nei suinetti e di Neo Tylan G250 nel mangime gestazione e senza Neo Tylan G250 nel mangime gestazione.
Grap. 3. *Mortality for diarrhea (%) in the farm A: pre treatment, by the use of Tylan® Soluble in the piglets and Neo Tylan® G250 in the gestating feed and without Neo Tylan G250 in the gestating feed.*

CONCLUSIONI

In entrambi gli allevamenti, l'uso di Tylan® Solubile nei suinetti al dosaggio di 30mg/kg pv ed in un caso anche nel mangime scrofe gestanti, ha fornito ottimi risultati.
In particolare ha fornito riduzioni di mortalità per diarrea sul totale del numero di morti, del 60 e 42%. La riduzione di mortalità è stata più evidente sulle scrofe con più di 2 parti (da 2 a 10).
La maggior vitalità dei suinetti, ha ovviamante anche portato ad una riduzione del

numero di animali schiacciati sottoscrofa, così come ad un minor numero di soggetti morti dopo il 7° giorno di vita.
Nell'allevamento A, l'utilizzo di Neo-Tylan® G250 nelle scrofe gestanti, ha sensibilmente migliorato la problematica enterica dei suinetti.

BIBLIOGRAFIA

G. Poli, A. Cocilovo (1996) – Microbiologia e Immunologia Veterinaria – pag. 257 – 260 - UTET.

Paolo Candotti (2004) – La protezione sanitaria dell'allevamento suinicolo – pag. 117-121 - Point Veterinarie Italie.

J. E. Collins et al. – Diarreha associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs – J Vet Diagn Invest 1:351-353 – 1989.

Il Manuale Merck Veterinario – Sesta edizione (1990) - Clostridium perfringens Type C Enteritis – pag. 209 – 211.

C. T. Collier et al. (2003) - Effects of Tylosin on Bacterial Mucolysis, *Clostridium perfringens* Colonization, and Intestinal Barrier Function in a Chick Model of Necrotic Enteritis - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 3311-3317, Vol. 47, No. 10.

Mark White (2007) - Clostridium perfringens infection in Piglets — NADIS Health bulletin- http://www.nadis.org.uk/

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO CONTRO *HAEMOPHILUS PARASUIS* MEDIANTE INDAGINE CLINICA DI CAMPO

EVALUATION OF THE EFFICACY OF AN HAEMOPHILUS PARASUIS *VACCINE THROUGH A FIELD CLINICAL INVESTIGATION*

CALISESI L.[1], CAPPUCCIO P.[1], POZZI P.[2], FIORENTINI L.[3]
[1] Gruppo Amadori, S. Vittore di Cesena (FC), [2] Intervet Italia, Peschiera Borromeo (MI); [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sez. di Forlì

Parole chiave: Malattia di Glässer, Vaccino, Clinica di campo.
Key words: Glässer's disease, Vaccine, Field's clinic.

Riassunto. E' stata condotta una prova di campo con lo scopo di valutare l'efficacia di un vaccino del commercio contro la Malattia di Glässer. Sono stati valutati nel corso della prova 2486 suini provenienti dalla medesima scrofaia (sito 1) e suddivisi in tre gruppi:
– Suinetti vaccinati (**SV**), nati da madri non vaccinate,
– Suinetti non vaccinati (**MV**) nati da madri vaccinate,
– Suinetti che non hanno ricevuto alcun intervento vaccinale (**C**).
Gli animali sono stati seguiti durante la permanenza in sito 2 e per i primi 24 giorni all'interno del sito 3. Sono state condotte osservazioni settimanali di tutti i gruppi che hanno consentito di rilevare la percentuale di soggetti con sintomi clinici riconducibili a Malattia di Glässer. Inoltre sono stati eseguiti esami autoptici e di laboratorio al fine di determinare la causa di morte dei soggetti deceduti nel corso della prova. Questo lavoro ha consentito di raccogliere un'importante mole di dati dai quali si deduce che le lesioni articolari si sono manifestate con una significativa minore incidenza nel gruppo MV.

Abstract. A field trial has been conducted with the purpose to appraise the effectiveness of a commercial vaccine aganist Glässer's disease. During the test 2486 piglets from the same firm (site 1) have been valued. They has divided in three groups:
– Vaccinated pigs born by not vaccinated mothers (**SV**),
– Not vaccinated pigs born by vaccinated mothers (**MV**),
– Not vaccinated pigs (**C**).
Piglets have been checked during the permanence in site 2 and for the first 24 days in site 3. Through weekly observations of all groups, percentage of piglets with clinical symptoms referable to Glässer's disease has been recorded. Besides we have performed laboratory and necropsy examinations on dead animals. From the data obtained we can conclude that a significant clinical variation was relative to articular pathologies in MV group.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è responsabile di una patologia diffusa in tutto il mondo denominata Malattia di Glässer.

E' un battere gram negativo, immobile, di forma bastoncellare e di lunghezza variabile. Sono note 15 sierovarianti che caratterizzano la virulenza, ovvero la capacità di indurre lesioni nell'ospite [1][Olvera A. *et al*., 2006] [Straw B.E. *et al*., 2006].
Il suino rappresenta l'ospite naturale di *Haemophilus parasuis*, infatti il battere viene comunemente isolato dalle secrezioni nasali e da tamponi tracheali di soggetti che non manifestano alcuna sintomatologia clinica. Al contrario l'isolamento dai polmoni e dal pericardio è spesso collegato alla malattia; *Haemophilus parasuis* è spesso un patogeno opportunista secondario nell'ambito del complesso delle patologie respiratorie del suino [2][Olvera *et al*., 2006] [Straw B.E. *et al*., 2006].
La malattia di Glässer è una malattia caratterizzata da elevata morbilità e mortalità, può colpire il suino in ogni fase del ciclo produttivo ed è caratterizzata da meningoencefaliti, poliartriti e polisierositi [Schwartz K.J., 2004]. Il calo dell'immunità materna, il rimescolamento e lo stress sono fattori predisponenti la malattia [Baumann G. and Bilkei G., 2002].
Scopo di questo lavoro è stato di valutare l'efficacia di un vaccino del commercio contro la Malattia di Glässer mediante indagine clinica di campo.

MATERIALI E METODI

Gli animali oggetto della ricerca provengono dalla medesima scrofaia (sito 1) composta da circa 1000 scrofe, a rimonta esterna situata in Centro Italia.
I 2486 animali coinvolti nella prova sono stati suddivisi in tre gruppi:
– 850 **s**uinetti vaccinati nati da madri non vaccinate (**SV**). Questi hanno ricevuto un doppio intervento vaccinale al giorno 19 e 40 di vita, quindi il primo intervento ancora in scrofaia ed il secondo all'interno del sito 2.
– 1116 suinetti nati da madri vaccinate (**MV**); le scrofe sono state vaccinate tramite un doppio intervento eseguito al giorno 80 e 95 di gestazione.
– 520 suinetti che non hanno ricevuto alcun intervento vaccinale (**C**). Tali animali rappresentano il gruppo di controllo.
Per evitare variabili la prova doveva essere condotta negli stessi siti 2 e 3 ma, per ovvi motivi logistici, gli animali in uscita dalla scrofaia sono stati distribuiti in allevamenti diversi. Di tale aspetto si deve tenere conto per una corretta comprensione della prova.

VACCINO. E' un vaccino commerciale inattivato contenente *Haemophilus parasuis* sierotipo 5 in dl - α - tocoferolo acetato. Scopo di tale vaccino è creare una immunizzazione attiva dei suini per ridurre le lesioni tipiche della Malattia di Glässer. Tale vaccino, come testimoniato da diversi articoli, evoca un'immunità protettiva verso il sierotipo 5 e protezione crociata verso i sierotipi numero 1, 12, 13 e 14, considerati più patogeni del 5 [Bak H. and Riising H.J., 2002] [Miniat *et al*., 1991] [Takahashi K. *et al*., 2001].
Secondo la casa produttrice, la vaccinazione eseguita nei suinetti (gruppo SV) determina la comparsa dell'immunità protettiva due settimane dopo il secondo intervento vaccinale e si protrae fino a 17 settimane post-vaccinazione [Bak H.and Riising H.J., 2002].
La vaccinazione delle scrofe (gruppo MV) permette il passaggio di anticorpi protettivi ai suinetti tramite il colostro [Baumann G. and Bilkei G., 2002] [Solano- Aguilar G.I. *et al.*, 1999].

Per ogni gruppo (SV, MV e C), sono stati raccolti dati per tutto il ciclo del sito 2 e per i primi 24 giorni del sito 3.
Parametri osservati e registrati:
– Clinica con cadenza settimanale effettuata dal medesimo operatore (sito 2),
– Mortalità con cadenza giornaliera (sito 2 e 3),
– Lesioni anatomopatologiche (sito 2 e 3),
– Diagnosi di laboratorio a supporto di quella autoptica (sito 2 e 3),
– Percentuale di scarti (sito 2),
– Accrescimento (differenza tra peso all'entrata in sito 2 ed in uscita da questo) (sito 2),
– Interventi terapeutici di massa o individuali e raccolta parametri qualitativi del mangime utilizzato (sito 2). Sono state utilizzate le medesime medicazioni e lo stesso mangime nei tre gruppi.
I segni clinici rilevati sono: alterazione dello stato del sensorio, alterazione della deambulazione o lesioni agli arti, alterazioni riconducibili a patologie respiratorie o enteriche. Ad ogni segno clinico riscontrato è stato attribuito un determinato punteggio, tanto più alto quanto più imputabile a Malattia di Glässer (tabella numero 1). In questa maniera si è costituito un "Clinical score" su base settimanale dei soggetti che presentavano alterazioni cliniche.

Tab. 1. Parametri esaminati e clinical score attribuito.
Tab. 1. *Parameters and clinical signs scoring*

Segno clinico	Clinical score
Stato del sensorio	
Depressione lieve	4
Depressione media	5
Depressione grave	6
Sintomi articolari	
Atassia	2
Zoppia di un arto	4
Zoppia di più arti	6
Incapacità a camminare	8
Sintomi respiratori	
Starnuto	1
Scolo nasale	2
Tosse modesta	3
Tosse evidente	4
Dispnea	5
Sintomo enterico	
Diarrea lieve	0
Diarrea grave	0

La mortalità è stata raccolta con cadenza giornaliera e, sui soggetti morti, è stato effettuato un esame autoptico al fine di verificare la presenza di lesioni riconducibili ad *Haemophilus parasuis*. Quando necessario sono stati inviati campioni al laboratorio per un supporto diagnostico.

RISULTATI

I risultati raccolti nel corso della prova sono riassunti di seguito.
Nella seguente tabella (numero 2) sono esposti i dati zootecnici che descrivono in maniera generale l'andamento dei tre gruppi in sito 2.

Tab. 2. Parametri zootecnici nel sito 2 (svezzamento).
Tab. 2. *Zootechnic parameters in site 2 (weaning).*

	SV	MV	C
Numero suinetti entrati	789	1111	518
Età media entrata sito 2 (gg)	25,07	25,07	25,07
Peso medio all'entrata (kg)	6,21	6,04	5,88
Numero suinetti usciti 1° scelta	691	1079	506
Numero suinetti usciti 2° scelta	76	32	10
Totale suinetti usciti	767	1111	516
Scarti presenti all'arrivo	32	6	1
Numero scarti reali	44	26	9
% soggetti 2° scelta	5,56	2,34	1,74
Numero suinetti morti	22	0	2
% mortalità	2,79	0,00	0,39
Età media uscita suinetti (gg)	70,4	69,53	69,07
Giorni medi permanenza sito 2	45,33	44,46	44
Peso medio uscita (kg)	19,89	27,01	24,58
Inc. pond. medio sito 2 (kg)	13,68	20,97	18,7
Inc. pond. medio giornaliero (kg)	0,30	0,47	0,43

Nella tabella 3 è elencato, per ogni gruppo, l'andamento settimanale della percentuale di soggetti con alterazione dello stato del sensorio, dell'apparato articolare, dell'apparato respiratorio e la sommatoria della percentuale dei sintomi.

Tab. 3. Percentuale di soggetti con segni clinici, gruppo SV, MV e C.
Tab. 3. *Percentage of piglets with clinical signs in groups SV, MV and C.*

	Settimana	1°set	2°set	3°set	4°set	5°set	6°set	7°set
SV	% stato del sensorio	0,38	0,51	0,38	0,76	1,01	2,17	0,78
	% sintomi articolari	0,38	0,38	0,25	0,83	2,03	1,66	1,56
	% sintomi respiratori	0,38	0,63	0,25	1,14	4,31	3,06	1,56
	Sommatoria % soggetti con alterazione clinica	**1,14**	**1,52**	**0,89**	**2,53**	**7,35**	**6,89**	**3,91**
MV	% stato del sensorio	0,45	0,27	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
	% sintomi articolari	0,45	0,36	0,18	0,45	0,54	0,54	1,09
	% sintomi respiratori	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Sommatoria % soggetti con alterazione clinica	**0,90**	**0,63**	**0,18**	**0,54**	**0,54**	**0,54**	**1,09**
C	% stato del sensorio	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00
	% sintomi articolari	0,58	1,35	1,16	0,58	1,78	1,58	4,34
	% sintomi respiratori	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Sommatoria % soggetti con alterazione clinica	**0,58**	**1,35**	**1,35**	**0,58**	**1,78**	**1,58**	**4,34**

Tramite i dati rilevati si è potuto creare la tabella numero 4 in cui è indicato il "clinical score", per ogni gruppo, dei soggetti che presentavano alterazioni cliniche.
Abbiamo cosi ottenuto un punteggio clinico medio dei soggetti con alterazione clinica, specifico per ogni apparato e riassuntivo generale.

Tab. 4. Punteggio clinico dei soggetti con segni clinici, gruppo SV, MV e C.
Tab. 4. Clinical scoring of piglets with clinical signs in groups SV, MV and C.

	Settimana	1°set	2°set	3°set	4°set	5°set	6°set	7°set
SV	Punteggio medio individuale stato del sensorio	4,00	4,25	4,33	4,17	4,13	4,41	4,33
	Punteggio medio individuale sintomi articolari	3,33	3,33	3,00	3,60	3,00	2,82	3,50
	Punteggio medio individuale sintomi respiratori	1,33	1,20	1,00	1,44	2,03	2,33	3,08
	Punteggio medio individuale generale	**2,89**	**2,75**	**3,00**	**2,80**	**2,59**	**3,13**	**3,50**
MV	Punteggio medio individuale stato del sensorio	4,00	4,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
	Punteggio medio individuale sintomi articolari	3,00	4,00	2,00	2,00	2,67	2,33	2,67
	Punteggio medio individuale sintomi respiratori	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Punteggio medio individuale generale	**3,00**	**4,00**	**2,00**	**3,00**	**2,67**	**2,33**	**2,67**
C	Punteggio medio individuale stato del sensorio	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Punteggio medio individuale sintomi articolari	3,33	2,57	2,67	2,67	2,67	3,75	3,00
	Punteggio medio individuale sintomi respiratori	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Punteggio medio individuale generale	**3,33**	**2,57**	**2,86**	**2,67**	**2,67**	**3,75**	**3,00**

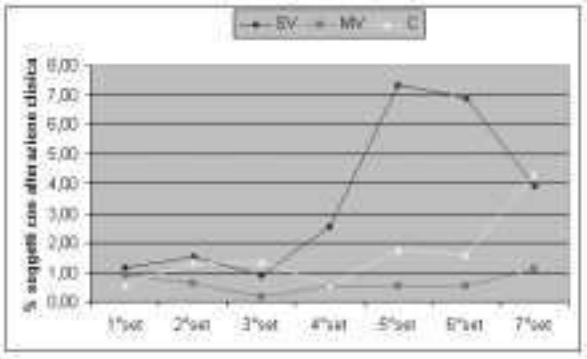
Nella tabella 5 è indicato, per ogni gruppo, l'andamento della mortalità con cadenza settimanale espressa in numero di soggetti morti e percentuale cumulativa.

Tab. 5. Mortalità settimanale nei diversi gruppi.
Tab. 5. *Weekly mortality in different vaccination groups.*

Settimana	1°set	2°set	3°set	4°set	5°set	6°set	7°set	Totale
SV	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	10 2,03	5 2,79	**22** **2,79**
MV	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	**0** **0,00**
C	0 0,00	1 0,19	0 0,19	0 0,19	0 0,19	0 0,19	1 0,39	**2** **0,39**

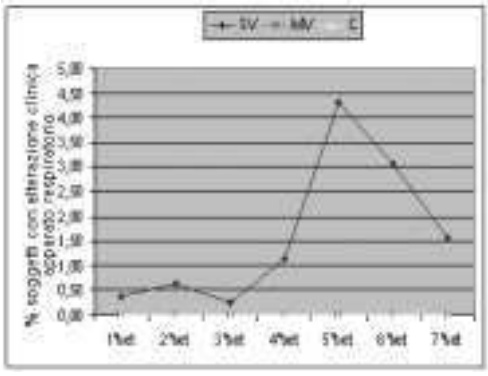
DISCUSSIONE

Nel grafico 1 sono rappresentati gli andamenti settimanali della percentuale di soggetti con alterazione clinica di ciascun gruppo.

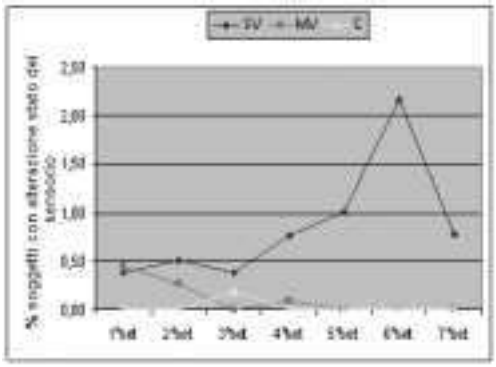


Graf. 1. Andamento settimanale della percentuale di soggetti con alterazioni cliniche dei gruppi SV, MV e C.
Graph 1. *Weekly percentage of piglets with clinical signs in different vaccination groups.*

Appare evidente come l'andamento del gruppo SV si discosti da quello degli altri due gruppi. Comparando tramite test di t-student l'andamento del gruppo SV rispetto a quello degli altri due, si ottiene un valore di p (livello di significatività) di 0.0173 tra gruppo SV e MV e di 0.1346 tra gruppo SV e C.
Vi è cioè una differenza statistica tra l'andamento (clinica e mortalità) del gruppo SV e MV mentre non vi è differenza statisticamente significativa tra gruppo SV e C.
Andando a scomporre la percentuale di soggetti con alterazione clinica in funzione dei vari apparati presi in considerazione per comporre tale dato (vedi grafico numero 2 e 3), si può notare come l'andamento del gruppo SV si discosti significatamene dall'andamento degli altri due gruppi sia prendendo in considerazione il parametro clinico respiratorio che lo stato del sensorio. La spiegazione di questo comportamento clinico del gruppo SV è da ricondurre ad un episodio di PRRS, confermato da analisi di laboratorio tramite PRRSV-PCR su polmone. Inoltre, sempre su polmone, è stata evidenziata la presenza di *Haemophilus parasuis* tramite PCR e mediante esame batteriologico di *Pasteurella multocida.*

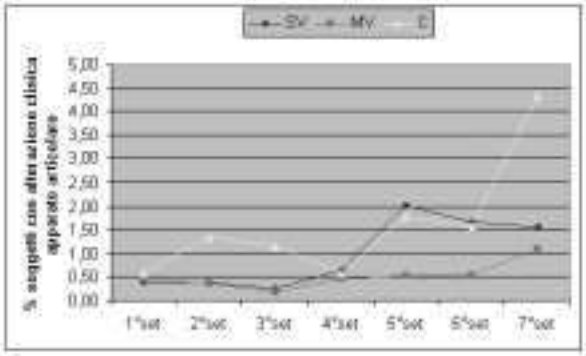


Graf. 2. Andamento settimanale della percentuale di soggetti con segni clinici respiratori.
Graph 2. *Weekly percentage of piglets with respiratory signs.*



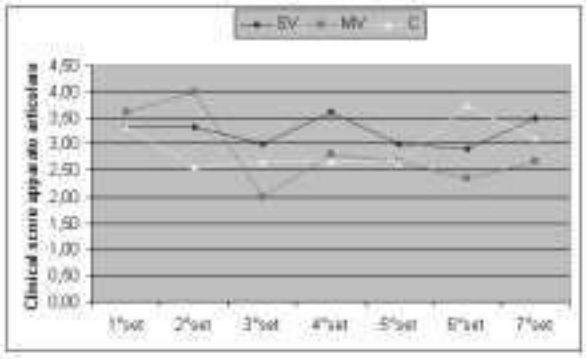
Graf. 3. Andamento settimanale della percentuale di soggetti con alterazione dello stato del sensorio.
Graph 3. *Weekly percentage of piglets with consciousness depression.*

E' inoltre importante sottolineare che tre soggetti appartenenti a tale gruppo morti in sito 3 hanno presentato, in sede autoptica, lesioni riconducibili a Malattia di Glässer e che gli esami laboratoristici hanno confermato, tramite PCR, la presenza di *Haemophilus parasuis*.
Come evidenziato da diversi articoli la concomitanza di infezione tra PRRSv e *Haemophilus parasuis* determina un aumento della patogenicità di quest'ultimo [Solano G.I. *et al*., 1997] [Solano G.I. *et al*., 1998] e per tale motivo il gruppo SV non può essere messo in comparazione con gli altri due gruppi con lo scopo di valutare un presidio immunizzante verso *Haemophilus parasuis*. Comparando l'andamento della percentuale dei soggetti con alterazione clinica dei gruppi MV e C (grafico numero 1) non si evince una differenza statisticamente significativa ($p = 0.0611$). Scomponendo tale parametro nei vari apparati che lo compongono (grafico numero 2 e 3) non si rilevano differenze tra l'andamento delle alterazioni cliniche dell'apparato respiratorio e le alterazioni dello stato del sensorio ($p = 0.2452$).
Al contrario, comparando le lesioni articolari tra i gruppi MV e C (grafico 4), si evince una differenza statisticamente significativa ($p = 0.0454$).



Graf. 4. Andamento settimanale della percentuale di soggetti con sintomatologia clinica articolare.
Graph. 4. *Weekly percentage of piglets with articular clinical signs.*

Nel grafico numero 5 è esposto il clinical score dei soggetti, appartenenti ai tre gruppi della prova, che hanno manifestato una alterazione clinica riconducile a patologia articolare.



Graf. 5. Andamento settimanale del clinical score in soggetti con segni clinici articolari.
Graph 5. Weekly evaluation of clinical score in pigkets with articular disease.

Comparando l'andamento del clinical score tra i gruppi MV e C non si evince differenza statisticamente significativa (p = 0.7619). Tale aspetto è indice di una equivalenza di gravità di manifestazione clinica dei soggetti colpiti da patologia articolare.

CONCLUSIONI

L'utilizzo dello score clinico e della percentuale di soggetti affetti da alterazione clinica su grandi gruppi di animali rappresenta uno strumento interessante per la valutazione di campo di un presidio immunizzante.
Dall'analisi dei dati raccolti si può dedurre che il sierotipo o i sierotipi di *Haemophilus parasuis* presenti in allevamento abbiano avuto un tropismo articolare. Dalla comparazione dei dati raccolti del gruppo MV (vaccinazione effettuata sulle scrofe durante la gestazione) e del gruppo C (soggetti che non hanno ricevuto nessun intervento vaccinale) si può evincere come l'utilizzo del vaccino abbia determinato una riduzione dell'incidenza delle patologie articolari.
Appare inoltre evidente, nel gruppo SV, come la concomitanza tra PRRS e *Haemophilus parasuis* determini un aumento della patogenicità di quest'ultimo con conseguente riduzione dell'efficacia della vaccinazione verso *Haemophilus parasuis.*

BIBLIOGRAFIA

Bak H., Riising H.J. (2002). Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. The veterinary record 151: 502 – 505.
Baumann G., Bilkei G. (2002). Effect of vaccinating sows and their piglets on the development

of Glasser's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5. The veterinary record 151: 18 – 21.
Miniats O.P., Smart N.L., Rosendal S. (1991). Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. Canadian journal of veterinary research 55: 37 – 41.
Olvera A., Calsamiglia M., Aragon V. (2006). Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. Applied and environmental microbiology 72: 3984 – 3992.
Olvera A., Segales J., Argon V. (2006). Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. Veterinary journal 15.
Schwartz K.J. (2004). Swine Disease Manual, Third Edition. Usa, American Association of Swine Veterinarians.
Solano-Aguilar G.I., Pijoan C., Rapp-Gabrielson V., Collins J., Carvalho L.F., Winkelman N. (1999). Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. American journal of veterinary research 60: 81 – 87.
Solano G.I., Bautista E., Molitor T.W., Segales J., Pijoan C. (1998). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the clearance of *Haemophilus parasuis* by porcine alveolar macrophages. Canadian journal of veterinary research 62: 251 – 256.
Solano G.I., Segales J., Collins J.E., Molitor T.W., Pijoan C. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. Veterinary microbiology 55: 247 – 257.
Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (2006). Diseases of swine, 9TH edition. Usa, Blackwell Publishing
Takahashi K, Naga S, Yagihashi T, Ikehata T, Nakano Y, Senna K, Maruyama T, Murofushi J. (2001). A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 63: 487 – 491.

STUDIO SUL BENEFICIO ECONOMICO (ROI) DELLA VACCINAZIONE ORALE NEI CONFRONTI DI *LAWSONIA INTRACELLULARIS* IN UN ALLEVAMENTO MULTISEDE

STUDY ON THE ECONOMIC RETURN (ROI) FROM THE ORAL VACCINATION AGAINST LAWSONIA INTRACELLULARIS *IN A MULTISITE SYSTEM*

U. ROLLA[1], C. LASAGNA[2], G. BORIOSI[2], P. MARTELLI[3], M. BUGLIESI[4], M. TERRENI[4]

[1]Libero Professionista, Alessandria; [2]Gruppo Martini, Budrio di Longiano (FC); [3]Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma; [4]Boehringer Ingelheim Italia S.p.A.

Parole chiave: Ileite, vaccinazione, beneficio economico
Key words: Ileitis, vaccination, economic return

Riassunto. La diffusione dell'Ileite negli allevamenti suini è un problema che interessa tutti i paesi a suinicoltura sviluppata; oggi, grazie a test sierologici eseguiti su larga scala, conosciamo che la prevalenza del batterio nei paesi Europei varia dal 50 al 100% dagli allevamenti testati. I danni economici causati dalla Ileite dipendono dalla forma clinica e dalla gravità con cui si manifesta, dalla percentuale dei soggetti colpiti, dall'età e dalla specifica situazione dell'allevamento. Per il controllo della Ileite sono disponibili differenti protocolli di medicazione strategica. Solo negli ultimi anni è stato registrato un nuovo ed innovativo vaccino vivo attenuato (Enterisol®Ileitis, Boehringer Ingelheim), da somministrarsi per via orale. Obbiettivo dello studio è stato la valutazione della efficacia, espressa in Ritorno sull'Investimento (ROI), della vaccinazione con Enterisol®Ileitis in un allevamento multisede, con anamnesi positiva per problematiche enteriche sostenute da *Lawsonia intracellularis*. In questa esperienza è stato raggiunto un ROI di 3,02:1, derivante dalla riduzione della mortalità, riduzione dei trattamenti con antibiotici iniettabili, riduzione dei costi di medicazione, riduzione del prodotto non conforme, aumento del numero di suini macellati.

Summary. Porcine Proliferative Enteropathy (PPE), often called Ileitis, is considered one of the most important infections related to enteric pathology. The oral faecal transmitted infection is caused by gram-negative bacterium: *Lawsonia intracellularis*, an intracellular obligate organism. In 2004 has been observed that a great percentage of farm (50-100%) in many countries is positive. The economic impact of ileitis is very important and is characterised by mortality, diarrhea and decreased growth performance. The treatment and the control of ileitis have been done in the past referring mainly to antibiotics. Since 2005 an attenuated live vaccine (Enterisol®Ileitis) is available in Italy for the active prevention of the damages caused by *Lawsonia Intracellularis*. Objective of this study was to evaluate the Return on the Investment (ROI) following the implementation of the vaccination in an Italian multisite production system, with

positive anamnesis for LI., compared to the traditional antibiotic prevention program. The vaccine has been able to reduce the antibiotic cost, reduce the mortality, increase the number of pigs to market and increase the number of pigs to slaughter in optimal market weight. The ROI calculate has been 3,02:1, confirming the benefit coming from the vaccine approach to Ileitis.

Introduzione

L'Enteropatia Proliferativa del Suino (Ileite), sostenuta da *Lawsonia intracellularis,* nel corso degli anni è divenuta una delle più importanti patologie enteriche nel panorama mondiale a causa dell'elevata diffusione del patogeno e delle gravi perdite economiche conseguenti alla infezione.
La diffusione dell'Ileite negli allevamenti suini è un problema che interessa tutti i paesi a suinicoltura sviluppata; la prevalenza del batterio nei paesi Europei, esaminata attraverso test sierologici eseguiti su larga scala, varia dal 50 al 100% dagli allevamenti testati (Ohlinger et al 2004; Mortimer et al 2000). Il dato epidemiologico nazionale aggiornato, 85,3 % di allevamenti positivi, conferma una situazione di elevata presenza del patogeno nel nostro sistema produttivo (Alborali et al, 2006). L'infezione dei suini da parte di questo batterio si associa a lesioni proliferative della mucosa dell'ileo e del grosso intestino con forme cliniche che influiscono sulla consistenza delle feci (da poco formate a emorragiche), sull'indice di conversione dell'alimento e sull'incremento ponderale giornaliero (WinKelman et al 1996).
I danni economici causati dalla Ileite dipendono dalla forma clinica e dalla gravità con cui si manifesta, dalla percentuale dei soggetti colpiti, dall'età e dalla specifica situazione dell'allevamento (Gebhart 2006).
La malattia ha tre forme cliniche principali : acuta, cronica e subclinica.
L'acuta si osserva più comunemente in animali dai 4 ai 12 mesi di età, comprendendo anche le scrofette, e si esprime con quadri emorragici acuti e morte improvvisa. Gli animali colpiti eliminano feci da rosse a catramose, che imbrattano la regione perineale del suino. Le feci sono sciolte e non formate. La perdita di sangue determina anemia causando un aspetto pallido dei suini. Le perdite economiche causate dalla forma acuta sono riconducibili soprattutto alla mortalità dei suini, che può raggiungere il 50% degli animali colpiti. Nella forma cronica, che colpisce prevalentemente suini di età compresa tra le 6 e le 20 settimane di vita, i segni clinici osservabili includono una diarrea non emorragica, perdita di peso e diminuito accrescimento, e una disomogeneità dei pesi nel gruppo. Questi segni sono rilevabili a livello di gruppo di suini, ma non necessariamente tutti insieme nello stesso soggetto. Il danno è da individuare in un peggioramento delle performance di crescita con minor incremento ponderale giornaliero (IPG), un peggiore indice di conversione dell'alimento (IC), una disomogeneità dei pesi dei suini al momento della vendita e nel costo dei medicamenti a cui si ricorre in caso di diarrea. Recentemente sono stati descritti anche i danni prodotti dalla forma subclinica, soprattutto riconducibili al peggioramento della conversione alimentare, dell'incremento ponderale giorno e alla disomogeneità, il tutto in assenza di segni clinici apprezzabili.

In uno studio condotto attraverso l'infezione sperimentale di un gruppo di suini con *Lawsonia intracellularis* si è osservata una riduzione in peso dei suini ammalati dall'8% al 31%, rispetto al controllo negativo. Inoltre, si è evidenziato che la necessità di alimento aumentava dal 6 al 33% per ogni Kg di incremento peso corporeo (McOrist et al 1999). Il microrganismo sopravvive per due settimane a 5°C e viene trasmesso per via orizzontale attraverso il contatto con le feci contaminate degli animali infetti La trasmissione diretta mediante il contatto di un suino recettivo con un suino escretore di *L. intracellularis* è la più frequente forma di infezione negli allevamenti. L'escrezione con le feci inizia circa sette giorni post-infezione e prosegue normalmente per 30-35 giorni; alcuni animali possono, però, rimanere escretori intermittenti fino a 12 settimane post infezione (Smith and McOrist 1997).
Per il controllo della ileite sono disponibili differenti protocolli di medicazione strategica, a base di antibiotici appartenenti alle classi dei macrolidi, tetracicline, pleuromutuline e lincosamidi. (McOrist, 2004). Nel 2005 è stato registrato un nuovo ed innovativo vaccino vivo attenuato (Enterisol®Ileitis, Boehringer Ingelheim), da somministrarsi per via orale.
Il vaccino è attualmente registrato per lo sviluppo di un'immunità attiva nei confronti di *Lawsonia intracellularis*, l'aumento significativo del peso dei suini e per la riduzione delle lesioni intestinali causate da *Lawsonia intracellularis.*
La somministrazione del vaccino ai suinetti, a partire dalla 3° settimana di vita, produce livelli significativi di immunità protettiva. La protezione è indipendente dalla modalità di somministrazione scelta, individuale orale (drench) o con l'acqua di bevanda in gruppo.
Obbiettivo dello studio è stato la valutazione della efficacia, espressa in Ritorno sull'Investimento (ROI), della vaccinazione con Enterisol®Ileitis in un allevamento multisede, con anamnesi positiva per problematiche enteriche sostenute da *Lawsonia intracellularis*.

Materiali e Metodi

Allevamento: lo studio è stato effettuato in un sistema multisede a tre siti, ubicato in centro Italia. Il sito 1 era rappresentato da un allevamento di 2300 scrofe, PRRS negativo,ripopolato nel 2005. Lo svezzamento dei suinetti avveniva a 21 giorni di vita, età alla quale i suini venivano trasferiti nel sito 2 Questo era suddiviso in 2 unità produttive: la prima composta da due capannoni, a loro volta divisi in 2 stanze contenenti ciascuna 1100 suini. La seconda unità era divisa in stanze da 550 suinetti ciascuna. I suinetti erano alimentati a secco e ad libitum. Il sito 3, con capienza di 1500 capi circa, riceveva gli animali a circa 20 Kg circa di peso vivo e li rimanevano fino alla macellazione. Anche in questo sito, l'alimentazione era ad libitum, a secco. Sia il sito 2 sia il 3 erano gestiti secondo la tecnologia del tutto pieno- tutto vuoto.
Anamnesi. Gli animali alloggiati nel sito 3 presentavano una sintomatologia clinica riconducibile a una forma cronica di Ileite: feci poco formate, disomogeneità dei pesi e ridotto incremento ponderale giornaliero. I sospetti sono stati poi confermati con esa-

mi sierologici che hanno evidenziato la presenza di anticorpi specifici contro *L. intracellularis* in allevamento, con sieroprevalenza del 100%

Animali. Nella sperimentazione sono stati arruolati 1400 suini, del peso medio di 22,01 Kg, di entrambi i sessi. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: il primo gruppo vaccinato e il secondo gruppo di controllo, trattato secondo il piano di medicazione strategica attivo in azienda. I soggetti inclusi hanno condiviso i medesimi ambienti durante la prova.

Gruppo Vaccinato: I suini sono stati vaccinati nel sito 2 (all'età di 45 giorni) con Enterisol®Ileitis. La modalità scelta per la somministrazione del vaccino è stata quella drench.

Gruppo Controllo: i suini hanno ricevuto nel sito 2, ad un'età di circa 50 giorni, un periodo di medicazione specificatamente mirata al controllo della Ileite: 7 gg con Tylosina 200 ppm, seguiti da altri 14 gg con Tylosina 100 ppm.

Trattamenti parenterali: sono stati raccolti i dati relativi ai trattamenti parenterali per problematiche enteriche effettuati nelle due popolazioni

Parametri: Gli animali sono stati monitorati nel periodo dell'ingrasso, ovvero dall'ingresso dei suini nel sito 3 alla loro successiva macellazione. Ai fini della valutazione economica sono stati considerati il numero di suini all'ingresso e alla fine del loro ciclo, i pesi all'arrivo e alla macellazione, i costi dei trattamenti antibiotici, oltre che il numero di suini venduti all'interno della griglia di prezzo maggiore. Parallelamente sono stati anche raccolti i dati relativi alla mortalità. Tutti i dati sono stati elaborati secondo la tecnica SPC (Statiscal Process Control) che consente di calcolare il ritorno sull'investimento (ROI) derivante dalla applicazione della vaccinazione.

Risultati e Discussione

Sono stati inclusi nella prova 700 suini per gruppo.

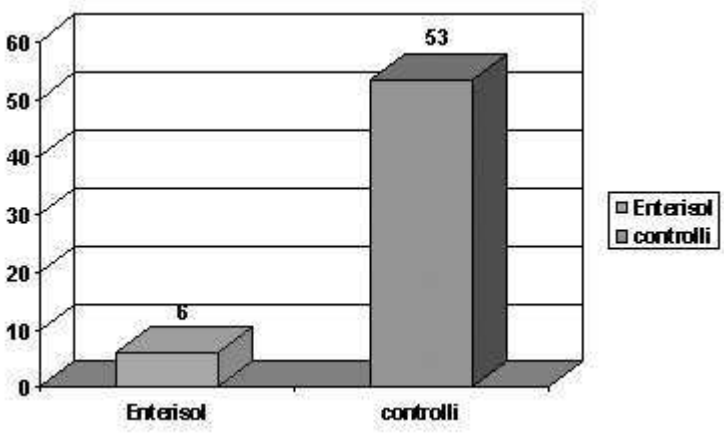
Tutti i suini appartenenti al gruppo dei vaccinati sono stati macellati assicurando il massimo prezzo di bollettino. Il gruppo dei suini vaccinati ha garantito un numero superiore di soggetti macellati in fascia di migliore prezzo, 678 vs 648.

Nel gruppo controllo 15 soggetti sono stati considerati fuori griglia ottimale:di questi 10 erano scarti, con peso finale inferiore di oltre il 35% rispetto a quello ideale di macellazione. Parallelamente la mortalità a carico del gruppo di controllo è stata più elevata e pari al 7,4% vs il 3,4% dei vaccinati.

Solo 6 suini tra i vaccinati sono stati sottoposti a trattamento parenterale mentre tale numero è salito a 53 nei controlli (+88%). (Grafico 1)

Per quanto riguarda le medicazioni, oltre al ciclo già pianificato con Tylosina (7 gg, 200 ppm seguito da 14, 100 ppm), il gruppo di controllo ha dovuto ricevere una medicazione di urgenza di 7 gg, circa 1 mese dopo il trasferimento nel sito 3, a base di Tylosina 200 ppm e di Tiamulina 160 ppm. Tale intervento è stato determinato dalla comparsa di una forma enterica a carico dei soli suini di controllo.

Il gruppo dei vaccinati ha garantito 113.004 Kg di carne pagata al prezzo massimo di bollettino mentre tale valore è stato di 111.001 Kg per i controlli: la differenza emersa è stata di 2003 Kg di carne a favore del gruppo dei vaccinati.



Graf. 1. Numero suini sottoposti a trattamento parenterale.

I giorni medi di ingrasso sono stati 188 nei controlli e 190 nei vaccinati, corrispondenti a 1,891 e 1,872 cicli /anno rispettivamente.
In entrambi gruppi, a seguito di problematica respiratoria, accompagnata da episodi di HBS (Haemorragic Bowel Sindrome), è stata effettuata una medicazione di urgenza di una settimana con Tylosina (5gg) e Amoxicillina (2gg), nella fase terminale di ingrasso.
L'elaborazione dai dati raccolti con metodologia SPC ha previsto il calcolo dei costi della vaccinazione, dei costi di medicazione, dei costi alimentari, dei costi dei trattamenti parenterali e dei ricavi derivati dalla vendita dei suini, sia di prima scelta come pure di quelli fuori griglia.

	Controllo	**Enterisol®Ileitis**
Ritorno economico		
Vendita suini (€/suino)	181.53	176.53
Costi		
Prezzo suino (€/suino)	50	50
alimentazione (€/suino)	123,39	119,94
Costo antibiotici (€/pig)	1	0
Perdite (€/pig)	7,07	3,13
***Margine Lordo* (€/pig)**	***0,07***	***3,46***
Differenza (€/pig)		**+ 3,39**

Nota: i calcoli sono stati effettuati secondo le seguenti assunzioni;
prezzo suino acquistato all'arrivo nel sito 3= €50;
prezzo vendita suino grasso €1,32/Kg;
costo alimento = €235/ton

La valutazione dell'impatto della vaccinazione a livello di singolo suino venduto ha prodotto un esito economico decisamente a favore dei vaccinati, con un beneficio lordo (escluso il prezzo del vaccino) di € 3,39 per suino.

La proiezione dei risultati nella condizione di vaccinazione di tutti i suini presenti nel sito 3, considerando la maggiore efficienza produttiva e l'inferiore numero di suini morti o remunerati a prezzo ridotto, porta la medesima struttura a produrre 86 suini in più/anno.

	Controllo	**Enterisol®Ileitis**
Produzione potenziale (cicli / anno * suini presenti)	1,891 * 1500= 2836	1872*1500=2808
Mortalità e prodotto non conforme	2836*7,4%= 210	2808*3,4%= 96
Produzione finale	2836-210= 2626	2808-96=2712
***Differenza* suini prodotti**		**+86**

Tale aumento in produzione porta il beneficio economico totale a € 9428/anno, o meglio € 6,29 per posto ingrasso. Il calcolo del Ritorno sull'investimento (ROI), conseguente alla introduzione della vaccinazione in azienda fornisce come risultato un valore di 3,02:1, decisamente premiante la scelta di utilizzare Enterisol®Ileitis come strumento di prevenzione e controllo dei danni causati dalla *Lawsonia intracellularis.*
I benefici conseguenti alla vaccinazione sono stati già oggetto di verifica approfondita in svariate esperienze sperimentali condotte in differenti nazioni.
Il ROI medio emerso dalla metanalisi delle prove condotti in 46 allevamenti Europei, tra cui è compresa l'Italia, è stato di 3,7:1, conseguente ai miglioramenti dell'incremento ponderale giorno (+ 46g/giorno), alla riduzione dell'indice di conversione (-0,07 Kg/Kg) e riduzione delle perdite (-3,78%). (Adam, 2007).

Conclusioni

Al fine di valutare correttamente il ROI è necessario focalizzare l'attenzione sul monitoraggio dei differenti parametri che concorrono alla determinazione finale del beneficio: le rese zootecniche, i costi degli antibiotici, la mortalità e l'omogeneità, .
In questa esperienza è stato raggiunto un ROI di 3,02:1, derivante riduzione della mortalità, dei trattamenti con antibiotici iniettabili, dei costi di medicazione, del prodotto non conforme e dall'aumento del numero di suini macellati.
Enterisol®Ileitis si è dimostrato efficace nel controllo dei danni prodotti da *Lawsonia intracellularis* in allevamento, assumendo il ruolo di importante strumento di ottimizzazione della resa.

Bibliografia

Adam M. (2007) *Economic impact of Enterisol® Ileitis in clinical and subclinical herds,* Proc. A. D. Leman Conference.

Alborali, L. (2005) *Ileite: Importanza economica, patogenesi, sintomatologia.* Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dall'allevamento. Brescia. 203-212

Alborali, L; Bugliesi, M; Zanoni, M; Salogni, C;Guadagnini, G; Tranquillo, V. (2006) *Study on seroprevalence of Lawsonia Intracellularis in Italian swine herd.* Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. 194

Gebhart, C. (2006) *Lawsonia Intracellularis Infections.* Proceedings of the 19th IVPS Congress, Copenhagen, Denmark. 48-53

Guedes, R.M.C.; Gebhart, C.J. (2003) *Comparison of intestinalmucosa homogenate and pure culture of the homologous Lawsoniaintracellularis isolate in reproducing profilerative enteropathy in swine.* Veterinary Microbiology. 93, 159-166

Hardge, T.; Kellr, CH; Steinhe, Tessier, PH; Salleras, JM; Rubio, P; Vestergaard, K; Cluydts, G; Ceccarelli, V; Pugliesi, M; Schippers, R; Johnson, K; Papatsas, I; Eiching, E; Rigat, J; Trela, T. (2006) *Serological prevalence of Lawsonia intracellularis across European Pig Herd*. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. 77

Hardge, T.; Nickoll, E.; Grunert, H.; Elbers, K.: Langbein, U.; Keller C.; Bleier, T.; Pohlenz, J.; Ohlinger, V.F.; Schroeder, B. (2004) *Prevention of procine proliferative enteropathy (PPE) by vaccination – efficacy and economics in European farms.* Pig Journal. 54, 17-34

Harold F.; Still, Jr; Reuel, R.; Hook, Jr and Darrell, A., Kinden, Keller, C.; Ohlinger, V.P; Nordengran, A.; Merza, M.(2004) *A Blocking ELISA for the detection of antibodies against Lawsonia Intracellularis.* Proceeding of the 18th IVPS Congress, Hamburg, Germany. 293

McOrist (2004) *Treatment and Control of ileitis*. Swine Disease Conference for Swinw Practitioners.50-53

McOrist, S. and Gebhart, C.J. (1999) Porcine proliferative enteropathies. In: Straw, B.E.; D'Allaire, S; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. (ed.). *Diseases of Swine*, 18th ed.Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.521-534

Mortimer, I; Van der Heijden, H.M.J.F; Henderson, L.E; Thomson,J.R; Lawrence, K. (2000): *Proficiency testing among European Laboratories using an immuno-fluorescent antibody test (IFAT) for the datection of antibodies against Lawsonia Intracellularis.* The 16th IVPS, Melbourne, Australia.

Nistal, P.R. (2005) *Epidemiology and Economic impact of Lawsonia Intracellularis*. Proceeding of European Enterisol Ileitis Symposium. 2-3

Ohlinger, V.F.; Pesch, S.; Knittel, J. (2000) *Prevalence of Lawsonia Intracellularis in diagnostic samples from Germany, the Netherlands, and Belgium*. The 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia.71

Smith, S.H. and McOrist, S. (1997) *Development of persistent intestinal infection and excrection of Lawsonia Intracellularis by piglets*. Research in Veterinary Science. 62. 6-10

Wendt, M.; Brandt, D.; Kaim, U. (2006) *Effects subclinical Lawsonia Intracellularis infection studied from weaning to slaughter.* Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 1,

WinKelman, NL (1996): *Ileitis: An update.* Compendium of continous Education for the Practicing Veterinarian. 18, S19-S27

STUDIO SIEROLOGICO LONGITUDINALE SULLA INFEZIONE NATURALE DA *LAWSONIA INTRACELLULARIS* IN DIFFERENTI SISTEMI DI PRODUZIONE SUINICOLA

LONGITUDINAL SEROLOGICAL STUDY ON THE NATURAL INFECTION FROM LAWSONIA INTRACELLULARIS*, IN DIFFERENT SWINE PRODUCTION SYSTEM*

TERRENI M.[1], MERIALDI G.[2], BONILAURI P.[2], BONCI M.[2], TITTARELLI C.[2]
[1] Boehringer Ingelheim Italia S.p.A.; [2] IZSLER sez. di Reggio Emilia

Parole chiave: Ileite, sierologia, età infezione, antibiotici
Key words: ileitis, serology, infection age, antibiotics

Riassunto. L'Ileite è una malattia infettiva enterica del suino, economicamente importante per il settore suinicolo. Differenti percorsi diagnostici sono disponibili per qualificare la presenza di *L. intracellularis* in azienda, la sierologia, la ricerca diretta del DNA del micorganismo (PCR) e l'isolamento. Obbiettivo di questo studio è stato la determinazione della presenza di *Lawsonia intracellularis* oltre che dell'età di infezione in differenti sistemi produttivi, multisede o a sito unico. Parallelamente, è stata analizzata la relazione tra somministrazione di antibiotici e infezione. La sieroprevalenza è progressivamente salita a partire dai 60 gg di vita (18%) fino ai 210 gg di vita (78%). L'età della prima infezione è stata più precoce negli allevamenti a sito unico rispetto al multisede. Gli antibiotici non hanno impedito l'infezione dei soggetti ed hanno determinato la presenza di sottopopolazioni di suini rimasti recettivi fino all'ingresso nell'ingrasso.

Summary. Ileitis is a worldwide disease responsible of relevant economic losses. Different diagnostic test are available for evaluating the presence and the diffusion pattern of Lawsonia intracellularis in farm. Objective of the study was to determine the presence and the evolution of seroprevalence, trough and ELISA test, in different production systems. At the same time, has been evaluated the relationship between the presence of antibiotics used for strategic medication and infection. The seroprevalence increase progressively, from 60 days of age (18%) to 210 (78%). The production system impact on the beginning of the infection, that was earlier in one site vs multisite. Antibiotics didn't prevent infection and produced subpopulation of infected pigs as well as negative, receptive pigs.

Introduzione

L'Ileite, anche conosciuta come enteropatia proliferativa, è una malattia infettiva enterica del suino, economicamente importante per il settore suinicolo, causata da *Lawsonia intracellularis*, un batterio che può infettare molte specie animali.

La malattia è caratterizzata da un ispessimento della mucosa dell'intestino tenue e talvolta del grosso intestino, conseguenza della proliferazione di cellule immature dell'epitelio intestinale e dell'assenza delle cellule caliciformi. Le lesioni istologiche caratteristiche dell'ileite proliferativa, rappresentate dall'iperplasia degli enterociti, sono osservabili al microscopio dopo ca. 11 giorni dall'inoculazione e raggiungono la loro massima espressione intorno al giorno 21° post-infezione. I primi segni di ispessimento intestinale si hanno ha partire dal 10°-11° giorno post-infezione e si fanno ben evidenziabili microscopicamente a partire dal 24° post-infezione. Le prime positività sierologiche si hanno dopo 15 giorni dall'infezione e il picco clinico avviene a circa 21 giorni dal contagio. Gli animali infettati rimangono sieropositivi per 13 settimane. L'immunità cellulomediata entra in funzione a partire dal 15° giorno post-infezione e prosegue per 13 settimane. Tutto ciò giustifica il periodo di incubazione relativamente lungo che contraddistingue l'ileite proliferativa, infatti si parla di 2-3 settimane. Inoltre l'eliminazione di *Lawsonia intracellularis* con le feci inizia a partire già da pochi giorni post-infezione e prosegue per 12 settimane. La presenza dell'antigene di Lawsonia intracellularis tramite metodiche immunoistochimiche è già rilevabile dopo 5 giorni dall'inoculazione. (Guedes et al. 2004)

La presenza dell'antigene di Lawsonia intracellularis non è rilevabile se non a livello di intestino, linfonodi e tonsille.

Sono descritte tre distinte forme cliniche: la acuta, la cronica e la subclinica (McOrist et al, 2006) e tutte sono state riconosciute responsabili di significativi danni economici per l'allevatore.

Differenti percorsi diagnostici sono disponibili per qualificare la presenza di *L. intracellularis* in azienda, la sierologia, la ricerca diretta del DNA del microrganismo (PCR) e, decisamente più laborioso, l'isolamento.

La PCR viene utilizzata principalmente per diagnosticare episodi clinici, per cui deve essere completata anche da altre indagini di laboratorio finalizzate a determinare la presenza di altri patogeni responsabili di enterite (*Brachyspira* spp, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*).

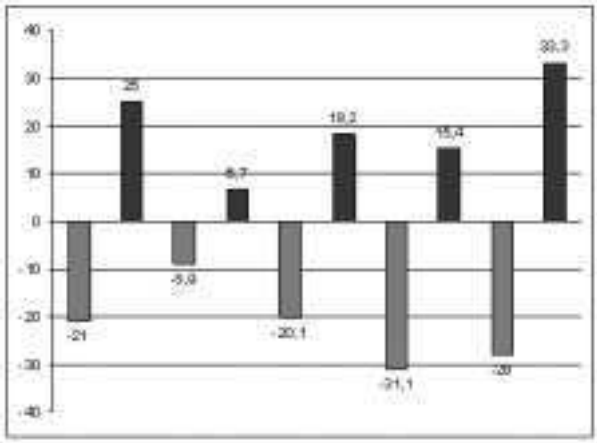
Attualmente sono disponibili tre differenti test per la determinazione della presenza di anticorpi specifici nei confronti di *Lawsonia intracellularis*: l'immunoflourescenza (IF), l'immuoperossidasi (IPMA) e una ELISA competitiva.

La sierologia viene comunemente utilizzata per confermare la presenza del patogeno in azienda, indipendentemente dalla presenza di forme cliniche, oltre che per determinare l'età di infezione. Tale informazione è necessaria per l'applicazione dei piani di profilassi vaccinale che devono essere pianificati in modo da assicurare la protezione prima della infezione.

L'impatto economico della Ileite è stato ampiamente studiato e definito. I parametri che sono coinvolti nel calcolo finale sono quelli legati all'impatto sanitario, mortalità, scarti e a quello zootecnico, incrementi, rese, omogeneità.

La condizione clinica che si determina a livello di azienda è condizionata dalla natura della forma di Ileite presente. In corso di forma cronica l'incidenza di suini clinici è generalmente elevata e si apprezzano sia la presenza della diarrea, sia la formazione di scarti, sia la disomogeneità del gruppo colpito.

In aziende che, al contrario, soffrono della forma acuta l'impatto clinico della patologia è decisamente più riconoscibile ma generalmente a carico di un numero inferiore di soggetti. I suini che soffrono di Ileite, in termini generali, subiscono un ridotto incremento ponderale giornaliero, un peggior indice di conversione alimentare, una disomogeneità del gruppo, una maggior richiesta di interventi antibiotici e, in funzione della forma coinvolta, un aumento della mortalità.
In una serie di studi effettuati da McOrist et al, 1997, è stato valutato l'impatto economico della malattia in suini infettati rispetto a controlli negativi alloggiati in stanze adiacenti. Tale modello è stato ripeto per 5 volte, al fine di raccogliere dati indipendenti rispetto all'effetto del singolo gruppo.
L'incremento ponderale giornaliero dei suini infettati era stato dal 8 al 31% inferiore rispetto ai controlli e l'indice di conversione superiore dal 6 al 33,3%. (grafico 1)



Graf. 1. Impatto % della Ileite sul IPG (rosso) e IC (blu). McOrists et al. 1997

Anche la forma subclinica è stata riconosciuta responsabile di significative perdite economiche e il suo impatto è stato definito pari a €3 per ogni suino colpito (McOrist, 2006).
Differenti proposte di controllo della Ileite sono state investigate e tutte prevedono la corretta conoscenza del modello di diffusione di *L. intracellularis* in allevamento. Rispetto altre malattie, è necessario premettere che la diffusione di LI è molto lenta e possono passare parecchie settimane tra le prime e le ultime infezioni, all'interno di un determinato gruppo di suini.
Alcuni antibiotici , soprattutto principi attivi appartenenti alle classi dei macrolidi, lincosamidi, pleruromutuline e tetracicline, sono stati testati per controllo delle forme cliniche. Tali esperienze hanno dimostrato una generale efficacia terapeutica dei differenti protocolli utilizzati, sia somministrando gli antibiotici con il mangime sia con l'acqua.

Naturalmente gli effetti dei trattamenti antibiotici sono limitati al periodo di somministrazione, lasciando i gruppi esposti agli effetti di infezioni successive.
Dal 2005 è disponibile sul mercato un vaccino vivo attenuato, da somministrarsi in singola soluzione per via orale, capace di produrre una immunità protettiva nei suini. Obbiettivo di questo studio longitudinale è stato la determinazione della presenza di *Lawsonia intracellularis* oltre che dell'età di infezione in differenti sistemi produttivi, multisede o a sito unico. Parallelamente, è stata analizzata la relazione che sussiste tra i programmi di medicazione strategica presenti nelle aziende e l'infezione, così da valutare se questi la impediscono o la ritardano.

Materiali e Metodi

Tre allevamenti a ciclo chiuso, due a sito unico e uno a tre siti, ubicati in Val Padana, sono stati inclusi nello studio.
Le aziende presentavano le seguenti caratteristiche:
allevamento A = 100 scrofe, ciclo chiuso, sito unico
allevamento B = 1500 scrofe a ciclo chiuso, multisede a tre siti.
Allevamento C = 550 scrofe a ciclo chiuso, sito unico
Sono stati raccolti i dati relativi ai programmi di medicazione strategica presenti in azienda, raccogliendo sia la natura dei principi attivi utilizzati sia i tempi di somministrazione.
In ogni azienda 5 nidiate, presenti all'interno della medesima sala parto, sono state selezionate con criterio random e, da ognuna di queste, almeno 5 suini sono stati casualmente scelti e identificati con marca auricolare, non numerata.
Tutti i lattonzoli inclusi nello studio hanno condiviso la medesime strutture di svezzamento e magronaggio-ingrasso e sono stati monitorati sierologicamente secondo un modello longitudinale di gruppo.
Nove scrofe per allevamento, alloggiate nelle sale parto in cui sono stati scelti i suinetti inclusi nello studio, sono state sottoposte a prelievo di sangue.
Il giorno prima dello svezzamento, a 60,90,150 e 210 gg di vita tutti i suini identificati con marca auricolare stati sottoposti a prelievo di sangue.
I campioni sono stati analizzati con il kit Enterisol ® Ileitis Elisa. Sono stati considerati come campioni positivi quelli che hanno espresso una percentuale di inibizione (PI) > di 30, negativi con PI < di 20 e dubbio con PI tra 20 e 30. Sono state esaminate le percentuali di sieropositività nei differenti tempi di prelievo.

Risultati

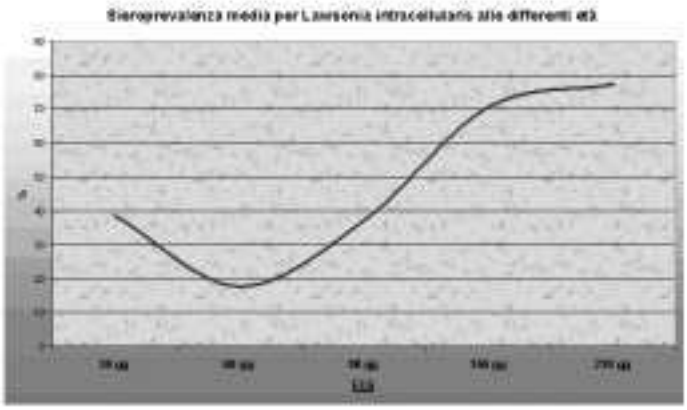
I prelievi di sangue sono stati effettuati secondo un modello longitudinale di gruppo.
Ottantatre suini sono stati inclusi nello studio, 30 nell'allevamento A, 25 nel B e 28 nel C.
Nella azienda A, i suino sono rimasti fino a 60 gg circa nello svezzamento e poi trasfe-

riti nel magronaggio-ingrasso, mentre nella C in svezzamento fino a 80 gg per poi essere trasferiti a terra, nel magronaggio-ingrasso. L'allevamento B, organizzato in multisede, ha previsto la permanenza dei suini in svezzamento fino a 70 gg (capannine) a cui è seguito il trasferimento nel sito 2, dove sono rimasti fino alla macellazione.
Parimenti differenti sono risultati i programmi di medicazione strategica implementati che hanno, in ogni modo, condiviso la presenza di medicazione per tutto il periodo di svezzamento. In A i suini hanno assunto mangime medicato a base di colistina (120 ppm) in svezzamento e colistina (120 ppm) + gentamicina (50 ppm) per tre settimane dopo la messa a terra.
In B, mangime medicato a base di amoxicillina (30 ppm) + colistina (120 ppm) per tre settimane, seguite da altrettante di medicato contenete tilmicosina (200 ppm). Dopo il trasferimento nel sito 2, i suini hanno ricevuto una medicazione a base di Doxiciclina (240 ppm) e colistina (120 ppm) per tre settimane.
Nell'ultima azienda, C, i suini hanno ricevuto una medicazione a base di Aminosidina (400 ppm) + Colistina (200 ppm) + Amoxicillina (30 ppm) per due settimane dopo lo svezzamento, seguita da una seconda medicazione a base di Tiamulina (200 ppm) e Clortetraciclina (800 ppm) fino al trasferimento. Alla messa a terra è stato somministrato un mangime medicato con colistina (120 ppm).In tutte le aziende è stata confermata la presenza di *Lawsonia intracellularis*, in ogni categoria di età esaminata. Le scrofe testate hanno espresso una sieropositività elevata, con valori compresi tra il 50% della azienda A all'89,5% del B (vedi tabella 1).

	Prelievo (gg)				
Antibiotici	30	60	90	150	210
A	**SI**	**SI**	**SI**	NO	NO
B	**SI**	**SI**	**SI**	NO	NO
C	**SI**	**SI**	**SI**	NO	NO

Tab. 1. Relazione tra età del prelievo e presenza di antibiotici nel mangime.

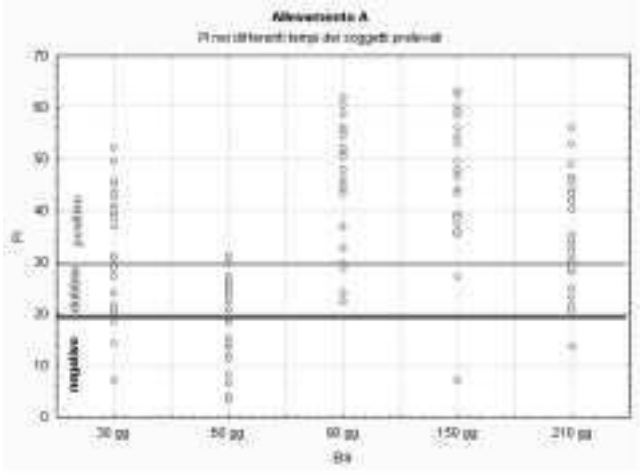
Nei suini in accrescimento la sieroprevalenza è stata del 38,6% a 30 gg di vita , a 60 gg 17,8%, seguita da un aumento progressivo del valore, 37,2% a 90 gg, 70,6% a 150 gg e 77,3% all'ultimo prelievo a 210 gg di vita. (grafico 1)
A livello di singole aziende, si è osservato che nell'allevamento A la sieroprevalenza è scesa dal 54% a 30 gg al 7% a 60gg, per poi aumentare in modo rilevante già a 90 gg.
Nel B, si è osservato un aumento della sieroprevalenza tra i 90 e i 150 gg, con ulteriore estensione del valore ai 210 gg di età. Nell'ultima azienda, la sieroprevalenza è salita tra 30 e 60 gg, per ridursi a 90 e poi risalire a 150 e 210 gg. (tabella 2)
I valori della percentuale di inibizione (PI) dei singoli suini sono statai più alti nelle aziende a sito unico rispetto a quelle multisede. (Grafico 2, 3, 4)



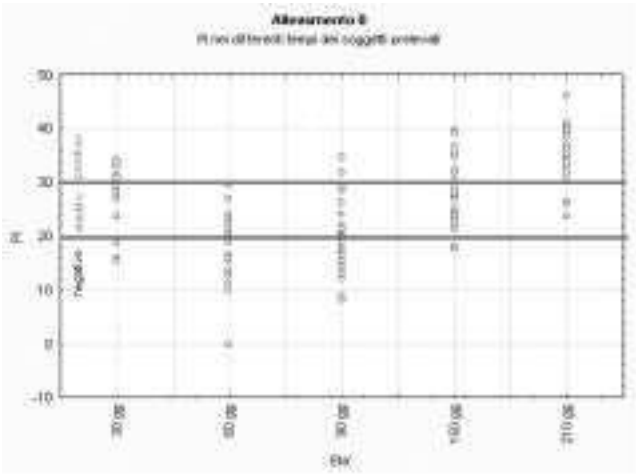
Graf. 1. Evoluzione della sieroprevalenza per L. intracellularis nelle differenti età.

Tab. 2. Percentuale di campioni positivi/dubbi/negativi in ogni allevamento, nelle differenti età

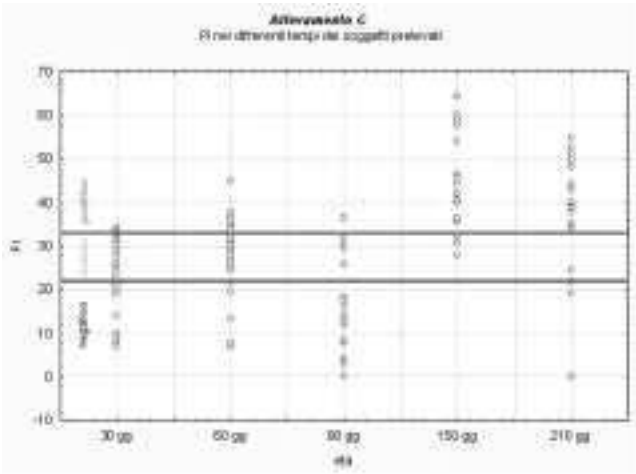
	CATEGORIA																	
	scrofe			30 gg			60 gg			90 gg			150 gg			210gg		
AZIENDA	pos	dubbio	neg	pos	dubbio	neg	pos	dubbio	neg	pos	dubbio	neg	pos	dubbio	neg	pos	dubbio	neg
A	90	10	40	54	26	20	7	43	50	87	13	0	97	3	0	85	27	3
B	80,5	10	9	26,7	46,0	27	8	39	61	8	38	54	48	40	12	88	12	0
C	88	12	0	34	36	29	46,5	36	17	29,7	0	70	75	25	0	79	8	13



Graf. 2. Azienda A- PI dei suini inclusi nello studio



Graf. 3. Azienda B- PI dei suini inclusi nello studio



Graf. 4. Azienda C- PI dei suini inclusi nello studio

Discussione

La prevalenza di aziende positive in Italia è stata recentemente indagata da Alborali et al, 2006, che hanno confermato una elevata presenza del patogeno (85% degli allevamenti) nel nostro territorio.
Uno studio europeo (Kellener et al, 2004), basato sulla valutazione sierologica di suini di differenti età, ha evidenziato un aumento della sieroprevalenza dal 10 al 30% dopo il trasferimento all'ingrasso. La sieroconversione, che avviene entro 3 settimane dopo

l'infezione (Guedes et al, 2003), è aumentata progressivamente a partire dalla 13° settimana di vita , come risposta specifica all'infezione.
L'elaborazione, invece, dei dati sierologici a livello di allevamenti ha disegnato un profilo differente, con il 40% delle aziende positive a 10 settimane , per poi salire a 62% a 13 e 86% a 18 settimane di vita.
Nello nostro studio longitudinale è stato osservato un aumento rilevante della prevalenza tra i 60 e i 90 giorni di vita, a determinare un'infezione intercorsa mentre i suini erano alloggiati nelle strutture di svezzamento.
Gli anticorpi di origine materna svaniscono entro 5-7 settimane di vita, pertanto le positività rilevate al primo prelievo sono da interpretare come residui di immunità passiva.
Gli anticorpi si dimezzano ogni tre settimane dopo il picco (Ghebart,2006),nella maggior parte dei suini, e la loro identificazione può risultare difficile 4-5 settimane dopo la loro comparsa. (Marsteller et al, 2003).
Sulla base dei dati raccolti, l'infezione nelle popolazioni esaminate si colloca tra le 7 e le 13 settimane di vita, in 2/3 delle aziende incluse nello studio.
Allo stesso tempo, l'aumento progressivo della percentuale di suini positivi al progredire della età dimostra come la diffusione di *L. intracellularis* in azienda è lenta, e non confinabile a specifici periodi. Il rapporto tra somministrazione di antibiotici per os e immunità è stato indagato da Collins nel 2004. Da tali studi è emerso che suini che hanno ricevuto antibiotici in continuo, ad elevate dosi, non si sono infettati e sono rimasti vulnerabili ad infezioni successive.
Parallelamente si è osservato come , all'interno di popolazioni medicate con dosi terapeutiche di antibiotici, alcuni suini, comunque, si infettano.
Nel nostro studio, la presenza in continuo di antibiotici nel mangime medicato, dallo svezzamento alle prime settimane dopo il trasferimento all'ingrasso, non ha impedito l'infezione di parecchi soggetti e la conseguente sieroconversione. La condizione sierologica osservata si è caratterizzata per una disomogeneità delle popolazioni, che hanno espresso sia suini sieropositivi, dunque infettati,sia sieronegativi e ancora suscettibili di infezione.
Il ricorso degli antibiotici per il controllo della Ileite , a fronte di una efficacia terapeutica dimostrata, soffre della impossibilità di proteggere il suino in tutte le fasi di accrescimento, Infatti, nelle aziende incluse nello studio, la loro somministrazione è terminata circa tre settimane dopo il trasferimento all'ingrasso, lasciando i suini ancora suscettibili di infezione dopo le 13 settimane di età, evento evidenziato dall'aumento della sieroprevalenza.
Parallelamente è necessario sottolineare come il ricorso degli antibiotici può modificare l'espressione clinica della malattia, favorendo la forma subclinica, responsabile di significative perdite economiche (€ 3 a suino infetto, McOrist, 2006).
L'analisi dei profili sierologici dei singoli allevamenti ha descritto alcune differenze nei tempi di aumento della prevalenza sierologica.
L'allevamento che ha presentato una sieroconversione successiva alle 13 settimane di vita è stato quello multisede. L'infezione si è, infatti, espressa solo dopo il trasferimento nel sito 2. La differente tipologia aziendale ha condizionato l'età di infezione, più

precoce negli allevamenti a sito unico e tardiva nel multisede.
Nelle due aziende a sito unico si sono osservati due differenti profili epidemiologici.
Nella A, all'infezione collocata tra 60 e 90 gg di vita, è seguito un aumento della prevalenza a 150 gg , poi leggermente diminuita a 210 gg.
In C, ad un iniziale aumento della prevalenza osservato tra i primi due tempi di prelievo, da collegare ad una infezione precoce, è seguita una temporanea diminuzione della prevalenza, riferibile ad una riduzione della circolazione . Questa condizione può essere associata alla somministrazione, nel secondo periodo di svezzamento, di un mangime medicato contenente una associazione di antibiotici comprendente sia una pleuromutulina sia una tetraciclina. I suini, dopo trasferimento nell'ingrasso, hanno subito una nuova ondata di infezione, con aumento della sieroprevalenza dal 16,7% al 75%.
Le PI dei singoli suini allevati in strutture a sito unico sono stati più alti rispetto a quelli dei suini del multisede, a confermare come la tipologia di allevamento condiziona i livelli di infezione da *L. intracellularis*.

Conclusioni

La sierologia si è confermata come un ottimo strumento per valutare l'età alla quale i suini vengono in contatto con *Lawsonia intracellularis*
L'infezione è iniziata durante la permanenza nello svezzamento negli allevamenti a sito unico, mentre ha colpito gli animali più tardivamente in quello multisede.
In tutte le aziende, il contatto con il patogeno è proseguito anche all'ingrasso, e molti suini si sono infettati solo proprio in questo settore.
Il modello di diffusione emerso in questo studio ha dimostrato come il periodo di rischio per l'infezione non rimane confinato in quello di somministrazione degli antibiotici, ma prosegue ben oltre. Gli antibiotici, in grado di controllare l'espressione della diarrea, non hanno impedito l'infezione di un numero significativo di soggetti. Questi suini possono aver sviluppato una forma subclinica di Ileite.
Inoltre, la presenza degli antimicrobici ha determinato la creazione di sottopopolazioni di suini che sono rimasti recettivi fino all'ingrasso e, dopo la sospensione della somministrazione, hanno subito l'infezione.
Qualora si decida di utilizzare la vaccinazione come strumento per produrre una immunità protettiva nella popolazione, questa deve essere effettuata almeno tre settimane prima dell'infezione e, nei differenti profili osservati, prima dei 30 giorni di età.

Ringraziamenti

Si ringrazia Antonella Soncini per l'insostituibile contributo tecnico ed i colleghi Gianni Barbieri, Sauro Guerzoni e Mauro Casali per la collaborazione in campo.

Bibliografia

Alborali, L; Bugliesi, M; Zanoni, M; Salogni, C;Guadagnini, G; Tranquillo, V. (2006) *Study on seroprevalence of Lawsonia Intracellularis in Italian swine herd.* Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. 194

Guedes, R.M.C.; Gebhart, C.J. (2003) *Comparison of intestinalmucosa homogenate and pure culture of the homologous Lawsoniaintracellularis isolate in reproducing profilerative enteropathy in swine.* Veterinary Microbiology. 93, 159-166

McOrist, S. et al; 1999; "Porcine proliferative enteropathy" in Straw et al "Diseases of swine" 8th edition, 521-534.

McOrist, S., Hardge,T., Gebhart, C., Ohlinger, V., Pohlenz; J., Keller, C., Voets, H., Walter,D.; 2006; "Porcine proliferative enteropathy–Technical manual 3.0" Boehringer Ingelheim.

Paradis, M.A.; McKay, R.I.; Wilson, J.B.; Vessie, G.H.; Winkelman, N.L.; Gebhart, C.J.; Dick, C.P. (2005): Subclinical ileitis produced by sequential dilutions of Lawsonia intracellularis in a mucosal homogenate challenge model. Porc. AASV 2005 ,189 - 191 **McOrist,S., Smith,S.H., Green,,L.E.** (1997)Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. Vet Rec. 1997 May 31;140(22):579-

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J. (2003)Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of Lawsonia intracellularis. Vet Microbiol. 2003 Feb 2;91(2-3):135-45.

Marsteller, T.A.; Armbruster, G.; Bane, D.P.; Gebhart, C.J.; Muller, R.; Weatherford, J.; Thacker, B. (2003): Monitoring the prevalence of Lawsonia intracellularis IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. Journal of Swine Health and Production 11 (3), 127 - 130

Gebhart, C. (2005): Diagnostics and immunity of ileitis. Pig Progress - Enteric Diseases Special III 01, 9 – 11

Marsteller, T.A.; Armbruster, G.; Bane, D.P.; Gebhart, C.J.; Muller, R.; Weatherford, J.; Thacker, B. (2003): Monitoring the prevalence of Lawsonia intracellularis IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. Journal of Swine Health and Production 11 (3), 127 – 130

Collins,A., Love, R. (2004): Risk factors for, and control, of ileitis. Proc, AAPV Conference, 110-117

EFFICACIA E VALUTAZIONE ECONOMICA DELL'IMPIEGO DI DRAXXIN IN CORSO DI PLEUROPOLMONITE SUINA

F. SALVINI *; G. GUADAGNINI*; G. MINELLI**
** Veterinario Libero Professionista - Brescia; ** Pfizer Animal Health Italia*

Parole chiave: Pleuropolmonite, *A. pleuropneumoniae*, Draxxin
Key Words: Pleuropneumonia, *A. pleuropneumoniae*, Draxxin

Riassunto. La prova di campo, effettuata in un allevamento a ciclo chiuso del nord Italia, riguarda l'utilizzo di un antibatterico iniettabile di nuova concezione (Draxxin), per la terapia della Pleuropolmonite da *A. pleuropneumoniae*. L'utilizzo di Draxxin viene messo a confronto con una medicazione a base di Amoxicillina e Lincomicina valutando, al termine della prova, i principali parametri zootecnici ed economici (costo-beneficio).
Draxxin si è rivelato particolarmente efficace per la terapia della Pleuropolmonite suina, permettendo una guarigione più rapida degli animali trattati, con conseguente notevole vantaggio zooeconomico, calcolato in € 7,07/capo.

Abstract. The trial was effectuated in a farrow-to-finish farm located in northern Italy. The trial regard a new injectable antibiotic (Draxxin) used for therapy of *A. pleuropneumoniae* infection.
A group treated with Draxxin is compared to a group medicated in feed with Amoxicillin and Lincomycin, analysing zootechnic and economic parameters (benefits and costs).
Draxxin showed a particular efficacy in the therapy of swine pleuropneumonia, with a more rapid recovery of treated animals and with an economic benefit of € 7,07/pig.

INTRODUZIONE

La Malattia Respiratoria del Suino rappresenta ancora oggi una delle maggiori cause di consistenti danni zootecnici nella realtà dell'allevamento italiano e sempre più si delinea come una patologia polifattoriale in cui concorrono patogeni batterici e virali nonché fattori legati al management e all'ambiente.
Questa esperienza di campo si è svolta per verificare l'efficacia di un nuovo antibatterico iniettabile nel controllo di una grave patologia respiratoria in un allevamento a ciclo chiuso della provincia di Cremona.
L'allevamento in cui è stata effettuata la prova, è un ciclo chiuso di 1500 scrofe, con rimonta interna. I settori di magronaggio (da 35 a 60 kg) ed ingrasso (da 60 kg fino alla macellazione), sono gestiti in flusso continuo ed i suini, in entrambi i periodi, manifestano allo spostamento gravi problemi respiratori.

La prova, è stata effettuata nel corso di un grave focolaio di pleuropolmonite da *A. pleuropneumoniae,* comparsa nella prima fase dell'ingrasso*,* e concomitante all'infezione da PRRS.

MATERIALI & METODI

La prova è stata effettuata su 1634 suini di circa 60 kg di peso, alloggiati in un unico capannone e trattati, dopo circa 15 giorni, alla comparsa dei primi sintomi di patologia respiratoria:

1° gruppo: 834 soggetti trattati con Draxxin (1 ml / 40 kg p.v.)

2° gruppo: 800 soggetti trattati per 7 giorni con una medicazione orale a base di Amoxicillina 400 ppm e Lincomicina 400 ppm.

Su tutti i soggetti di entrambi i gruppi, si è valutata la percentuale di morti e scarti, mentre su un numero significativo per ogni gruppo (405 e 315, rispettivamente G1 e G2) si sono rilevati i dati produttivi (ICA, AMG) ed economici (costo-beneficio).

Per meglio valutare la rapidità della risposta terapeutica, gli animali sono stati pesati, oltre che ad inizio e fine prova, anche dopo 30 e 70 giorni dall' introduzione nel capannone di ingrasso.

RISULTATI

Come evidenziato in tabella 1, si è osservata una sensibile riduzione della percentuale di suini di scarto, nel gruppo trattato con Draxxin.

Tab. 1. Percentuale di morti e scarti
Tab. 1. *Percentage of died pig and culled pig*

	DRAXXIN	CONTROLLO
N° SUINI ENTRATI	834	800
% SUINI MORTI	2,15	1,75
% SUINI SCARTI	4,4	9,35

Allo stesso modo anche le performances zootecniche, si sono rivelate decisamente superiori nei suini sottoposti a trattamento iniettabile, con miglioramento sia dell'accrescimento medio giornaliero (AMG), che dell'efficienza alimentare (ICA).

Tali miglioramenti si sono riscontrati sia includendo che non, gli animali morti e di scarto.

I notevoli miglioramenti evidenziati in Tabella 2, sono soprattutto dovuti ad una evidente differenza di incrementi ponderali, nella fase immediatamente successiva all'intervento terapeutico.

In particolare il gruppo 1 (Draxxin), ha mostrato incrementi ponderali nettamente superiori già nel periodo immediatamente successivo al trattamento rispetto al gruppo 2 . (Tab 3)

Tab. 2. Performance zootecniche
Tab. 2. *Zootechnic performances*

	Draxxin	Medicazione orale	Differenza %
N. suini	405	315	
Peso medio in entrata (kg)	61,3	67,8	
Peso medio in uscita (kg)	169,3	157,3	
Giorni permanenza	141	133	
AMG (g) Senza scarti e morti	0,806	0,744	+ 7,7%
AMG (g) Compresi scarti e morti	0,766	0,677	+ 11,6%
Conversione Compresi scarti e morti	3,83	4,01	+ 4,5%

Tab. 3. Incrementi ponderali (grammi/giorno)
Tab. 3. *Pig performance (grams/day)*

Giorni permanenza	Draxxin	Medicazione orale	% miglioramento
30	0,787	0,586	+ 25,55
70	0,864	0,736	+ 14,9

Al termine della prova è stata effettuata una valutazione economica, considerando i vantaggi zootecnici ed i costi dei trattamenti. I risultati emersi sono evidenziati in tab 4.

Tab. 4. Valutazione economica
Tab. 4. *Economic valuation*

	Draxxin	Medicazione orale
COSTO TRATTAMENTO /capo	2,55 € + costo mano d'opera	1,4 € *
Differenza incremento: + 8,37 Kg (62 gr x 135 gg) Prezzo suino / kg: 1,15 € **Guadagno: 8,37 x 1,15 = 9,62 €**		
Maggior profitto per suino vs. medicazione orale 9,62 - 2,55 = + 7,07 €		

*costo medicazione 10€/q

CONCLUSIONI

Il gruppo trattato con Draxxin (gruppo 1), ha mostrato, in corso di un grave focolaio di pleuropolmonite, dati zooeconomici decisamente superiori rispetto a quelli del gruppo trattato con medicazione orale nell'alimento. In particolare, un evidente miglioramento è stato osservato nei primi 30 giorni di ingrasso, come conseguenza di una più rapida risposta terapeutica, ad ulteriore conferma del vantaggio di un trattamento iniettabile monodose (Draxxin), rispetto ad una tradizionale medicazione orale.

BIBLIOGRAFIA

Waag, TA, Rooney et al. (2006) – Proc 19th IPVS. Vol 2 p.20-19
Alan B. Scheidt, Terri A. Waag (2007) – Proc 38th AASV. p.199-203

INDAGINE PRELIMINARE SULL'ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ISOLATI DA SUINO NEL PERIODO 2005-2007

ZANONI M., GUADAGNINI G., GRADASSI M., SALOGNI C., D'INCAU M. E. ALBORALI L.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: *Salmonella typhimurium*, Kirby-Bauer, suino
***Key words**: Salmonella typhimurium, Kirby-Bauer, swine*

Riassunto. Dall'indagini batteriologiche anatomopatologiche, eseguite nel periodo 2005-2007, su campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino sono state isoalti 197 ceppi di *Salmonella typhimurium.* L'esame batteriologico per isolamento di salmonella è stato effettuato con la metodica "Annex D ISO 6579: 2002" e le salmonella sono state sottoposte ad identificazione biochimica e sierologia; si è valutata la sensibilità in vitro con il metodo Kirby Bauer. Dai risultati ottenuti si osserva che una buona percentuali di ceppi è resistente a 10 antimicrobici testati (Amoxicillina, Cloramfenicolo, Doxiciclina, Penicillina, Sulfadiazina, Tetraciclina, Tiamulina, Tilmicosina, Spectinomicina, Streptomicina).

Abstract. The purpose of this survey was to describe antibiotics resistance of 197 *Salmonella typhimurium* strains. Salmonella was isolates from faecal, linph-node samples and post-mortem material during years 2005-2007. Salmonella was isolated with "Annex D ISO 6579: 2002" and identified by biochemical and serological test. Susceptibility testing was performed using Kirby-Bauer method against a panel of 30 antimicrobials. Significantly very high resistance was observed in 10 antimicrobials (Amoxicillin, Cloramphenicol, Doxycyclin, Penicillin, Sulfadiazine, terraccline, tiamuline, Tilmicosine, Spectinomicin, Streptomycin)). Frequently of no resistance-no susceptible level was higher (> 10 % of *Salmonella typhimurium* strains) in 7 antimicrobials considered low resistance and used also against pig enteric pathogens.

INTRODUZIONE

La *Salmonella typhimurium* è universalmente riconosciuta come una degli agenti patogeni più importati negli animali e nell'uomo.
Le infezioni da salmonella rappresentano in tutti i paesi industrializzati una delle principali zoonosi a trasmissione alimentare. Nel suino, questa patologia, è un evento piuttosto frequente anche se, solitamente, decorre in forma asintomatica.
Le normative comunitarie, di recente emanazione, prevedono come misura di controllo delle salmonellosi l'attuazione di piani di monitoraggio finalizzati a ridurre la prevalenza del patogeno a partire dalle produzioni primarie.

Questo controllo effettuato nell'allevamento suino si è reso indispensabile per ridurre il rischio di infezioni nell'uomo essendo effettiva la possibilità che ceppi di salmonella multiresistenti agli antibiotici, possano interferire e complicare la terapia di salmonellosi in medicina umana.
Scopo di questo lavoro è quello di fornire una panoramica sull'andamento della sensibilità in vitro di alcuni dei principali antibiotici utilizzati nell'allevamento suino verificando contemporaneamente l'antibiotico resistenza nei confronti degli antibatterici testati a questo scopo anche dal centro di referenza Nazionale per l'antibiotico Resistenza.

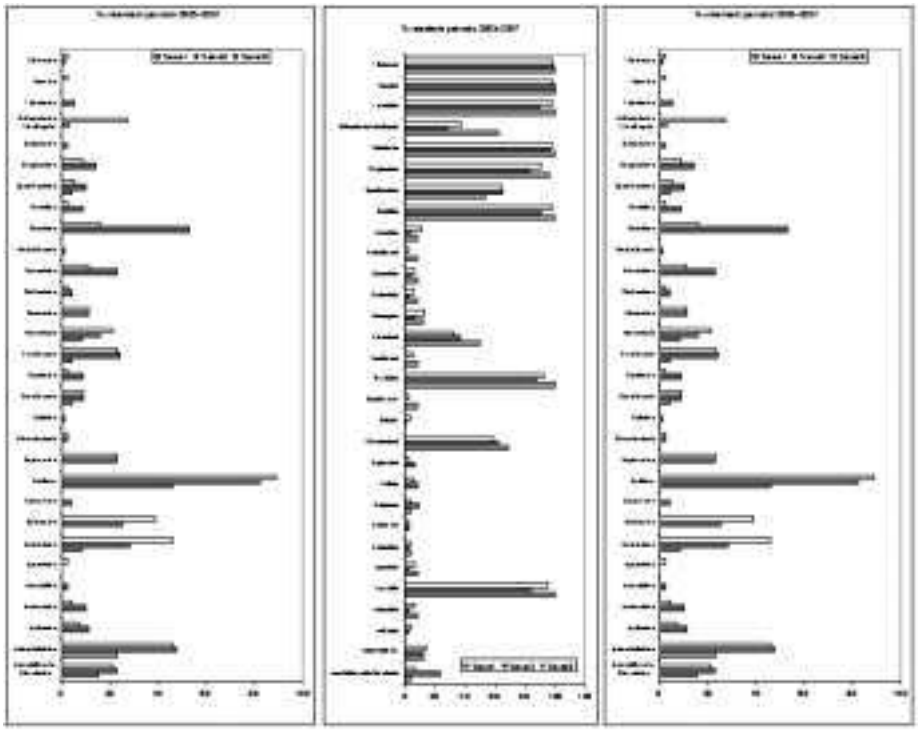
MATERIALI E METODI

Per valutare l'antibiotico resistenza di ceppi di *Salmonella typhimurium* e *Salmonella typhimurium* var-5, nel periodo compreso fra il 2005 ed il 2007, i campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino, pervenuti presso la Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER), per indagini batteriologiche ed anatomopatologiche, sono stati analizzati per ricerca di salmonella.
Dai campioni esaminati sono stati isolati n° **129** ceppi di *Salmonella typhimurium* e n° **68** ceppi di *Salmonella typhimurium var*-5.
L'isolamento delle salmonelle è stato effettuato con la metodica "Annex D ISO 6579 : 2002", obbligatoriamente prevista nell'ambito dell'attuazione dei piani di monitoraggio e controllo di salmonella a livello di produzioni primarie. Questa metodica prevede l'utilizzo dei seguenti tipi di terreni:
– arricchimento in APTS;
– pre-arricchimento selettivo in terreno semisolido
– isolamento selettivo-differenziale in XLT_4.
A questa metodica è stata affiancata anche la procedura di isolamento già in uso presso il nostro laboratorio, che prevede l'utilizzo nella fase di pre-arricchimento del terreno liquido RVB e nella fase di isolamento del terreno differenziale selettivo Hecktoen.
L'identificazione delle salmonella è stata effettuata con test biochimici (ONPG, TSI, gallerie di identificazione) e con la classificazione in base al sierotipo.
193 ceppi identificati come *Salmonella typhimurium* e *Salmonella typhimurium* var-5 sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità in vitro nei confronti di 30 antimicrobici che comprendono i principali antibatterici impiegati nell'allevamento suino e quelli previsti nel programma dello studio dell'antibiotico resistenza, fornito dal Centro di referenza Nazionale per l'Antibiotico resistenza.
Il test di sensibilità agli antibatterici è stato eseguito con la metodica Kirby Bauer (1,2). La lettura degli aloni di inibizione è stata fatta in doppio con il sistema automatizzato Sirscan 2000 e con la lettura manuale, utilizzando un righello millimetrato.

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabella 1 e sono espressi come percentuale di ceppi risultati resistenti, intermedi e sensibili al test in vitro eseguito utilizzando i 30 antimicrobici utilizzati nel nostro laboratorio nel periodo 2005, 2006 e 2007.

Tab 1. Percentuale di ceppi risultati resistenti, intermedi e sensibili nel periodo 2005-2007.
Tab 1. *Percentage strains resistant, intermediate and sensibility in the period of 2005-2007.*



DISCUSSIONE

L'evoluzione dell'antibiotico resistenza dei ceppi di *Salmonella typhimurium* isolati nel periodo 2005-2007 è risultata pressoché costante, tenuta anche in considerazione la brevità del periodo oggetto dello studio. Una elevata percentuale di ceppi di *Salmonella typhimurium* (> 80 %) ha dimostrato di essere resistente a 10 antibatterici ed in particolare a Amoxicillina, Cloramfenicolo, Doxiciclina, Penicillina, Sulfadiazina Tetraciclina, Tiamulina, Tilmicosina, Spectinomicina e Streptomicina. Risultati analoghi sono stati ottenuti in studi condotti in Italia nel periodo 1994-2000 (3) e recentemente in Olanda (4) e in Spagna (5).

Per contro Aminosidina, Amikacina, Apramicina, Cefquinone, Colistina, Danofloxacin, Flumequina, Gentamicina, Marbofloxacin, Cefaloridina, Ceftiofur, Sulfametazio-

na/Trimethoprim sono i 12 antimicrobici risultati essere maggiormente attivi in vitro nei confronti di . *Salmonella typhimurium.* Vi sono inoltre altri antibatterici quali Acido Nalidixico, Cephazolina, Cefotaxime , Enrofloxacin, Florfenicolo, Kanamicina, Neomicina, verso i quali salmonella ha evidenziato una resistenza molto contenuta pur dimostrando una % più elevata di ceppi considerati " intermedi" (da 13% a 53%).
E' utile sottolineare che la maggior parte dei ceppi di *Salmonella typhimurium*, isolati negli ultimi 2 anni, presenta una resistenza elevata nei confronti di alcuni antibatterici quali Amoxicillina e Tetracicline, che vengono ampiamente impiegati nell'allevamento suino. Restano comunque disponibili, per il controllo della salmonella in allevamento, principi attivi somministrabili sia per os che per via parenterale che se utilizzati in casi di necessità e in maniera oculata si sono dimostrati efficaci anche in vitro (6).
Alla luce di quanto esposto è importante ribadire la necessità di utilizzare un protocollo diagnostico che preveda l'esecuzione del test di sensibilità in vitro sul ceppo isolato in corso di patologia soprattutto in episodi ad eziologia multipla. Questo consentirebbe, pur consapevoli del valore indicativo e non assoluto dal dato di laboratorio, di ottimizzare il trattamento terapeutico e di attuare un costante monitoraggio dell'evoluzione del fenomeno dell'antibiotico resistenza dei ceppi di *Salmonella typhimurium* isolati nell'allevamento suino.

Ringraziamenti

Si ringraziano i tecnici di laboratorio Laura Birbes, Giuseppe Orlandi e Gianpaolo Ughini per la collaborazione fornita.

BIBLIOGRAFIA

NCCLS (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

NCCLS (2004) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Barigazzi G., Foni E., Garbarino C. (2001). Sensibilità agli antibatterici di microorganismi isolati dal suino nel periodo 1994-2000. Atti XXV Meeting Sipas, Parma, 23-24 Marzo 2001, 295-303.

Van der Wolf P.J. (2007). Salmonella (sero)types and their resistance patterns isolated from pig faecal and post-mortem samples in 2000-2003 Proceedings 7th Safe Pork, Verona 9-11 maggio 2007 ,389-393.

Astorga RJ.,Salaberria AE.,Garcia AM.,Jimenez SV.,Martinez AC.,Garcia AA.,Casas AA. (2007). Surveillance and antimicrobial resistance of Salmonella strains isolated from slaughtered pigs in Spain. J Food Prot. 70 (6):1502-1506.

Zanoni M., Salogni C., Guadagnini G.,Gradassi M., Tagliabue S., Alborali L., (2007) Sensibilità in vitro agli antibatterici di *Salmonella sp*. *E.coli* emolitico isolati da suino in episodi di patologie enteriche nel periodo 2002-2006 Atti XXXIII Meeting Sipas, Modena , 29-30 Marzo 2007, 421-427.

MONITORAGGIO DELLA PATOLOGIA RESPIRATORIA ATTRAVERSO LA VALUTAZIONE DELLE LESIONI POLMONARI, PLEURICHE E DELLA SIEROLOGIA

MONITORING RESPIRATORY DISEASE AT SLAUGHTERHOUSE USING LUNG AND PLEURAL LESIONS SCORE AND SEROLOGY

MERIALDI G.[1], BONILAURI P.[1], DOTTORI M.[1], NIGRELLI A.[2], MARTELLI P.[3]
[(1)] IZSLER, Sezione di Reggio Emilia; [(2)] IZSLER, Sezione di Mantova;
[(3)] Dipartimento di Salute Animale , Università di Parma

Parole chiave: malattia respiratoria, macello, lesioni polmonari, pleuriche, sierologia
Key words: respiratory disease, slaughterhouse, lung lesions, pleurisy, serology

Riassunto. Il monitoraggio delle lesioni polmonari al macello è uno strumento efficace per stimare la prevalenza e la gravità della malattia respiratoria. Sono stati descritti diversi metodi per la valutazione della Polmonite Enzootica (PE) e delle lesioni attribuibili ad *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) al macello. La valutazione delle lesioni polmonari e pleuriche in combinazione con i dati derivati dalla sierologia possono fornire una precisa immagine dell'impatto della malattia respiratoria a livello d'allevamento. I risultati dell'indagine effettuata al macello su 46 aziende hanno permesso di evidenziare lesioni riferibili a polmonite enzootica ed a pleurite cronica rispettivamente nel 46.3% e nel 49% dei polmoni esaminati. Tra i patogeni respiratori indagati mediante sierologia PRRSV, *Actinobacillus pleuropneumoniae* hanno presentato una prevalenza del 100% tra gli allevamenti.

Summary. Monitoring of lung lesions at slaughterhouse is an efficient tool to estimate the prevalence and severity of respiratory disease. Different methods have been described for the evaluation of Enzootic Pneumonia (EP) or lesions due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) at slaughterhouse. Lung and pleural lesions scoring in combination with serological data can provide a picture of the impact of respiratory disease at herd level. The results at slaughterhouse on 46 batches from different herds showed lesions referred to EP and to Chronic Pleuritis (CP) respective in 46.3 and 49.0% of the examined lungs. Among the respiratory pathogens, PRRSV and App revealed a 100% seroprevalence.

Introduzione

L'indagine dell'incidenza delle malattie in sede di macellazione permette di indagare sullo stato di salute dell'allevamento anche in relazione a patologie che siano decorse in forma subclinica o paucisintomatica (1). In diversi Paesi Europei il monitoraggio

delle lesioni al macello viene utilizzato anche come fonte di informazioni di tipo epidemiologico per patologie ad impatto produttivo, oltre che per finalità ispettivo-sanitarie in senso stretto (2). La malattia respiratoria è considerata il problema sanitario di maggior impatto economico nella moderna produzione suinicola (2), ed il rischio si è accresciuto di pari passo con l'intensificarsi delle produzioni (2).
Il monitoraggio delle lesioni polmonari al macello è ormai oltre un decennio riconosciuto come efficace strumento per la stima di prevalenza e gravità della malattia respiratoria in generale e per la valutazione dell'incidenza di Polmonite Enzootica (PE) (3, 4) nonché di lesioni pleuriche (2, 5). Queste ultime, soprattutto sotto forma di Pleuriti Croniche (PC) costituiscono un riscontro comune in sede di macellazione (2, 5, 6) a livello di lobi ventro-craniali e dorso-caudali. Relativamente a quest'ultima localizzazione, dorso caudale, vi è una ampia convergenza nella loro attribuzione ad infezione e relativa malattia da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) (5, 7). Il rilevamento delle lesioni pleuriche in sede di macellazione solo superficialmente può essere considerato come un problema impattante le sole manualità di lavorazione delle carcasse (8), essendo da tempo correlato il loro riscontro con minori performance e significativo allungamento dei tempi d'accrescimento (8, 9) del suino.
In questo lavoro viene descritto un metodo di rilevamento delle pleuriti croniche (PC) recentemente perfezionato (10), ed imperniato sulla attribuzione di un punteggio derivante dalla valutazione concomitante di localizzazione ed estensione-gravità delle pleuriti croniche. Il dato relativo a PC è stato integrato con il rilevamento delle lesioni riferibili a polmonite enzootica (PE) e dall'analisi delle sieroprevalenza d'allevamento (9, 11) verso App, *M. hyopneumoniae,* Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRS), Virus dell'Influenza Suina (SIV) - sierotipi H1N1, H1N2, H3N2. Inoltre, tramite la somministrazione di un questionario appositamente predisposto, sono stati raccolti dati anamnestici (2, 10), relativi alla tipologia d'allevamento, alla gestione dei flussi degli animali, all'esecuzione di piani di profilassi vaccinale per App e M hyo, a riscontri diagnostici di laboratorio specificamente per App, e alla presenza di forme respiratorie clinicamente manifeste anche in relazione al periodo di comparsa.

Materiali e metodi

Sono stati inclusi in questo studio 46 allevamenti di cui non era preliminarmente noto alcun elemento anamnestico per malattia respiratoria, nel periodo compreso tra Marzo e Dicembre 2007. Gli allevamenti sono situati in Pianura Padana e finalizzati alla produzione di suino pesante (peso di macellazione 160 kg). Da ogni allevamento è stato preso in considerazione e monitorato al macello un lotto di suini, mediamente 100 polmoni/lotto (10), per un totale di 4689 animali. Venti campioni di sangue per ogni lotto di macellazione sono stati prelevati alla eiugulazione (160 kg). Da ogni allevamento sottoposto a monitoraggio in sede di macellazione, sono stati prelevati anche 20 campioni di sangue in soggetti di 80 kg di peso. I campioni di sangue, sottoposti a centrifugazione, sono stati congelati e conservati sino al momento del completamento della

raccolta per tutte le Aziende e per tutti i lotti al macello. Sono stati quindi sottoposti ad indagine sierologia presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER), Sezioni Diagnostiche di Reggio Emilia e di Mantova, secondo le metodiche in uso presso i Laboratori, e come di seguito indicato:
– App: test sierologico ELISA-competizione (IDEXX); il test evidenzia la presenza di anticorpi anti-tossina Apx-IV di App e fornisce un risultato di tipo qualitativo: positivo-negativo
– M hyo: test sierologico ELISA-competizione (IDEXX); i risultati sono espressi come rapporto s/p
– PRRSV: test sierologico ELISA-competizione (IDEXX); i risultati sono espressi come rapporto s/p.
– SIV: test di Inibizione dell'Emoagglutinazione (metodo interno IZSLER) nei confronti dei sierotipi H1N1, H1N2, H3N2); il test fornisce il risultato relativo all'ultima diluizione avente attività inibente l'emoagglutinazione.

Alla catena di macellazione le lesioni riferibili a PE sono state valutate, secondo la griglia di Madec (13) mentre le lesioni riferibili a PC sono state sottoposte a valutazione utilizzando il metodo recentemente implementato (10) e denominato "SPES" (*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System* - sistema di valutazione al macello delle pleuriti). SPES prende in considerazione:
– l'assenza (punteggio 0) o presenza (punteggio da 1 a 4) di lesioni;
– la loro localizzazione (antero-ventrale; dorso-caudale; lobi diaframmatici);
– la mono o bi-lateralità;
– l'estensione della lesione nel lobo interessato (estensione maggiore o minore di almeno 1/3 del lobo colpito).

La Tabella 1 illustra il Punteggio SPES in relazione alla tipologia della lesione.

Tab. 1. Griglia SPES per la valutazione delle Pleuriti Croniche
Tab. 1. *The SPES grid for Chronic Pleuritis scoring.*

Punteggio	Caratteristiche della lesione
0	Assenza di lesioni da PC
1	Lesioni antero-ventrali: aderenze pleuriche tra lobi o ai bordi ventrali dei lobi
2	Lesioni focali dorso-caudali monolaterali
3	Lesioni bilaterali di tipo 2 o lesioni monolaterali estese (almeno 1/3 di un lobo diaframmatico)
4	Gravi lesioni bilaterali estese (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici)

La griglia SPES fornisce due risultati: il valore medio SPES che descrive un grado generale di pleurite. Inoltre, le lesioni specifiche pleuriche croniche sono state valutate calcolando un ulteriore indice per App, denominato (APPI) che fornisce informazioni su prevalenza e gravità delle pleuriti dorso-caudali e calcolato come segue: *frequenza*

delle lesioni dorso-caudali (con punteggio 2, 3 e 4) *moltiplicato* per la *media delle lesioni* dorso-caudali (punteggiate 2, 3 e 4).
I risultati ottenuti sono stati analizzati anche in relazione ai dati anamnestici ottenuti dai questionari. Sono state inoltre valutate le correlazioni tra PE, SPES, punteggio AI (APPI), sierologia ed anamnesi d'allevamento.
Analisi statistica: per il confronto dei punteggi di score polmonare e di superficie polmonare osservati nelle differenti partite di macellazione sono stati utilizzati sia test parametrici come l'analisi della varianza (ANOVA), che test non parametrici come il tst della mediana (Pearson Chi^2) o il test Mann-Whitney (two samples Wilcoxon rank sum). I test non parametrici sono stati affiancati al test ANOVA quando non erano verificate le condizioni di omogeneità delle distribuzioni confrontate.

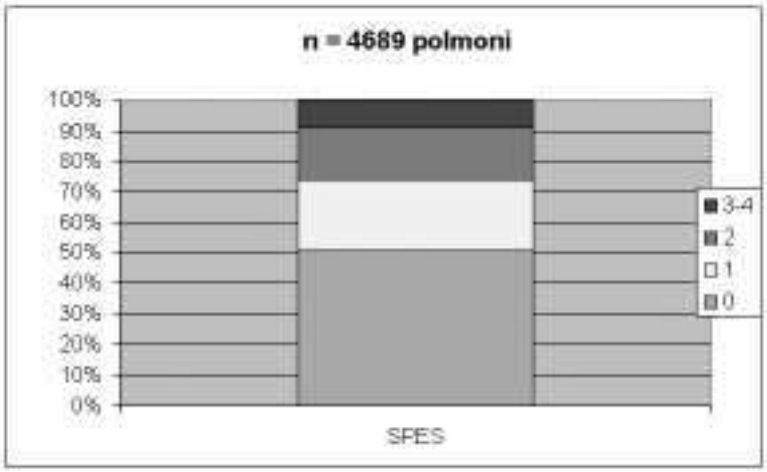
Risultati

Una parziale descrizione dei punteggi polmonari è descritto in Tabella 2.

Tab.2. Risultati relativi al punteggio per lesioni da PE e da PC
Tab. 2. *Results from slaughterhouse check relative to EP and CP lesions.*

		Percentile		
Parametro	Media	25°	50°	75°
EP	1.04	0	0	1
SPES	0.86	0	0	2
APPI	0.64	0.51	0.58	0.79

Le lesioni da PE sono risultate evidenti complessivamente nel 46,3% dei polmoni.
Il 49% dei 4869 polmoni di suino osservati presentava lesioni riferibili a PC, mentre il 26% presentava lesioni pleuritiche croniche riconducibili a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumonie*. In dettaglio, lesioni a Punteggio SPES = 2 costituivano il 17,3% dei casi, mentre lesioni a Punteggio SPES = 3 e 4 erano presenti rispettivamente nel 7,3% e 1,6% dei suini.
Gli allevamenti che dall'indagine anamnestica riferivano una diagnosi di laboratorio con isolamento di App da soggetti deceduti a seguito di malattia respiratoria (8 casi) hanno fatto registrare valori di SPES e di APPI significativamente più elevati rispetto agli altri ($p<0.01$). Si deve segnalare che tra gli allevamenti "problema per App", quelli che applicano un piano vaccinale specifico hanno evidenziato punteggi di SPES ed APPI inferiori, anche se le differenze non sono risultate statisticamente significative.
Il Grafico 1 riassume in forma grafica le lesioni pleuriche osservate.



Graf. 1. Distribuzione dei punteggi pleurici (griglia SPES) tra gli 4869 polmoni osservati al macello.
Graph. 1. *Distribution of pleurisy scoring (SPES grid) from 4869 checked lungs.*

I risultati delle indagini sierologiche sono riportate nella Tabella 3.

Tab. 3. Percentuale di allevamenti sieropositivi e prevalenza d'allevamento di patogeni respiratori, relativamente a 46 aziende osservate
Tab. 3. *Percentages of seropositive herds and herd prevalence of respiratory pathogens in 46 herds.*

		Prevalenza d'allevamento (%)			
	% Aziende Positive	0 - 25%	26 -50%	51-75%	76- 100%
APP 80 kg	100	5	9	21	65
APP 160 kg	100	4	0	0	96
Mhyo 80 kg	91	22	28	20	22
PRRS 80 kg	100	0	0 2	98	
H1N1 160 kg	78	29	22	12	15
H1N2 160 kg	14	5	7	2	0
H3N2 160 kg	63	30	9	5	21

La siero-prevalenza per App è risultata del 100% sia nei soggetti di 80 kg che in sede di macellazione. L'infezione da PRRSV è ampiamente diffusa in tutti gli allevamenti (100%) considerati. La siero-prevalenza per *M. hyopneumoniae* (91% degli allevamenti) è significativamente correlata con il riscontro di PE a livello di lotto esaminato ($p<0.01$; $R^2=0.13$).
Si deve segnalare che gli allevamenti che hanno una anamnesi vaccinale positiva per *M. hyopneumoniae* e per PRRS mostrano un minor punteggio SPES rispetto ad allevamenti non vaccinati ($p<0.01$).

Discussione

I rilievi ottenuti confermano quanto precedentemente segnalato (10) ed in particolare che il metodo SPES ben si presta ad una applicazione in sede di macellazione (oltre 400 suini/ora) producendo utili informazioni sull'impatto delle pleuriti.
I risultati della presente nota preliminare hanno evidenziato che lesioni polmonari specifiche da PE e da PC sono ampiamente diffuse nei suini macellati in Italia, sebbene il ciclo di produzione sia più prolungato e sia pertanto attesa una quota di soggetti che per effetto della *restituito ad integrum* vedono una regressione delle lesioni con conseguente possibile sottostima rispetto alla clinica della malattia respiratoria. La prevalenza di App (basata sul test sierologico che evidenzia anticorpi anti-Apx IV) non si correla con la prevalenza di pleuriti croniche in sede di macellazione, probabilmente poiché il test sierologico utilizzato non discrimina tra sierotipi a differente patogenicità (12). Entrambi gli indici SPES ed APPI sono risultati più elevati in allevamenti con anamnesi positiva per pleuropolmonite clinica supportata da isolamento del microrganismo, confermando l'importanza di App nel determinismo delle pleuriti croniche nel suino.
Ulteriori indagini dovranno essere rivolte a verificare la correlazione tra lesioni pleuriche croniche in sede di macellazione e riscontri sierologici e batteriologici negativi per App.

Bibliografia

Martelli P, (1999) "Prevalenza di lesioni polmonari in suini al macello in Italia" Atti XXV SIPAS, 91-96

Cleveland-Nielsen A, Nielsen E, Ersboll A, (2002) "Chronic pleuritis in Danish slaughter pigs", Prev. Vet Med, 30; 55 (2):121-135

Dottori M, Gusmara C, Leotti G, Ostanello F, Sala V, (2004) " Impiego del punteggio polmonare al macello nella valutazione della malattia respiratoria da *M hyopneumoniae* nel suino pesante", Corso in Patologia Suina, Brsecia, atti XXVII: 143-156

Morrison R.B., Huilley H, Leman A, (1985), "Comparison of methods for assessing the prevalence of and extent of pneumonia in market weight swine" Can. Vet. J., 26: 381-384.

Sørensen V. et al (2006), "Disease of the respiratory system" in: Diseases of Swine, 9th ed., 149-177.

Grest P, Keller H, Sydler T, Pospichil A, (1997) "The prevalence of lung lesions in pigs at slaughter in Switzerland", Shweiz Arch Tierh, 139 (11):500-506

Christensen N, (1998), "A unified scoring system for pleurisy in slaughter pigs" 15O IPVS, 255

Hartley P, Wilesmith J, Bradley R, (1988), "The influence of pleural lesions in the pig at slaughter on the duration of the fattening period: an on-farm study" The Vet Rec, 123: 208

Mousing J, Lybye H, Barfod K, Meyling A, Ronsholt L, e Willeberg P, (1990) "Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing syste-related risk factor" , Prev Vet Med 9: 107-119

Dottori M, Nigrelli A, Bonilauri P, Merialdi G, Gozio S, Cominotti F, (2007) "SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). Proposta per un nuovo approccio ispettivo delle lesioni polmonari in sede di macellazione", XXXIII SIPAS:

Enoe C, Mousing J, Schirmer A, Willeberg P, (2002) “Infectious and rearing-system related risk factors for chronic pleuritis in slaughterpigs”, Prev Vet med 54 (4):337-349

Maes D, Chiers K, Haesenbrouk F, Laevens H, Verdonck M, de Kruif A, (2001) 2 Herd factors associated with the seroprevalence of App serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds” Vet Res, 32 (5): 409-419

Madec F, Kobish M, (1982), “Bilan lesionel des poumones de porcs charcutiers a l’abbatoir.” Jour. Res. Porc. 14 : 405-412

APPLICAZIONE FORENSE DI POLIMORFISMI STR PER LA TRACCIABILITÀ GENETICA DI CAMPIONI BIOLOGICI RACCOLTI NEL PIANO DI SORVEGLIANZA SIEROLOGICA DELLA MALATTIA VESCICOLARE DA ENTEROVIRUS DEL SUINO

FORENSIC ANALYSIS OF STR MARKERS FOR THE GENETIC IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL SAMPLES COLLECTED IN THE SEROLOGICAL SURVEILLANCE PROGRAM OF SWINE VESICULAR DISEASE

ROBINO C.[1], MENEGON S.[1], CARATTI S.[1], GINO S.[1], TORRE C.[1], ORIGLIA S.[2], VIARA S.[2], SONA B.[3]

[1] Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino, Corso Galileo Galilei 22, Torino; [2] Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Piazza Grosso 82 Moretta (CN); [3] Servizio Veterinario ASL CN1, Area Sanità Animale, Via Torino 143, Savigliano (Cuneo)

Parole chiave: genetica forense; identificazione; short tandem repeat; malattia vescicolare del suino.
Key words: forensic genetics; identification; short tandem repeat; swine vesicular disease.

Riassunto. Il sistema di amplificazione multiplex Animaltype Pig PCR Amplification kit (Biotype AG), che consente la simultanea genotipizzazione di 11 marcatori STR tetramerici ed un locus Amelogenina-simile per l'identificazione individuale e la determinazione del sesso nel maiale (*sus scrofa*), è stato impiegato in un indagine giudiziaria riguardante un presunto caso di falso in atto pubblico. Nell'ambito del programma di sorveglianza della Malattia Vescicolare del Suino (MVS) il veterinario responsabile della raccolta di sangue a campione da scrofe ibride Landrace x Large White di un allevamento della Regione Piemonte è stato accusato di aver effettuato prelievi multipli da un singolo animale. L'analisi genetica mediante STR del siero residuante da cinque provette di sangue sospette ha rilevato che due campioni condividevano lo stesso profilo genetico. Inoltre, gli alleli di questo profilo erano costantemente presenti nei profili misti ottenuti dai tre campioni rimanenti. Sulla base della distribuzione allelica degli undici marcatori STR impiegati, osservata in un campione di ibridi Landrace x Large White provenienti da allevamenti piemontesi, sono stati calcolati la probabilità di associazione di caratteri identici nelle distinte ipotesi di consanguineità o non consanguineità e il rapporto di verosimiglianza per l'interpretazione di profili genetici misti. I risultati ottenuti supportavano fortemente l'ipotesi che tutti i campioni contenessero siero proveniente da un unico animale. Il caso descritto dimostra chiaramente l'utilità di disporre di sistemi rapidi ed efficienti per la tracciabilità genetica di campioni suini.

Abstract, The Animaltype Pig PCR Amplification kit (Biotype AG), a multiplex PCR system that allows the simultaneous amplification of 11 tetrameric STRs and an Ame-

logenin-like locus for individual identification and sexing of pig (*sus scrofa*), was employed in the investigation of an alleged case of forgery. A veterinarian responsible for collecting random blood samples from Landrace x Large White crossbred sows from a pig farm located in Piedmont, as part of the program for the serological surveillance of Swine Vesicular Disease, was accused of having drawn multiple samples from a single animal. STR typing of sera derived from the five questioned blood tubes revealed that two samples shared the same DNA profile. Moreover, alleles of this profile where constantly present in mixed profiles obtained from the remaining three samples. Random match probabilities under the distinct hypotheses of unrelatedness and relatedness, as well as likelihood ratios for mixtures interpretation, were calculated based on the allele distribution of the 11 STRs observed in a local population sample of Landrace x Large White pigs from Piedmont. The obtained results strongly supported the conclusion that all the samples included serum originating from a single sow. The case here described is a clear example of the potential benefits deriving from the use of fast and effective typing systems for the genetic identification of pig biological samples.

Introduzione

Negli ultimi anni, l'utilizzo di tecniche biomolecolari per l'identificazione individuale e l'indagine genetica di paternità è andato imponendosi quale valido strumento di controllo della qualità alimentare e di tutela della salute pubblica in ambito veterinario. La disponibilità di metodiche e marcatori polimorfici per la tipizzazione genetica delle principali specie da allevamento può consentire di risalire all'azienda di provenienza di animali ai quali siano state diagnosticate malattie infettive, di effettuare test per determinare la provenienza di prodotti che vantano peculiari qualità alimentari (ad esempio carni di suini "biologici") e di verificare l'accuratezza dei pedigree nei centri di selezione [1]. In questo tipo di indagini, veterinari e genetisti forensi possono collaborare fattivamente, integrando le competenze maturate nei rispettivi campi di attività.
A tale proposito descriviamo l'applicazione di un sistema di PCR multiplex per l'analisi di loci polimorfici Short Tandem Repeat (STR) di maiale (*sus scrofa*) -strutturato in modo del tutto analogo a quelli attualmente disponibili per l'analisi identificativa di microtracce biologiche umane in casi giudiziari- nell'indagine su un presunto caso di *malpractice* veterinaria.
Un veterinario incaricato di effettuare il prelievo di sangue a campione da scrofe (ibride Landrace x Large White allevate in una azienda piemontese), come disposto dall'Ordinanza del Ministero della Sanità del 26 Luglio 2001 "Piano Nazionale di eradicazione e sorveglianza della malattia vescicolare e sorveglianza della peste suina classica", fu accusato di aver effettuato più prelievi da un unico animale; dei dodici campioni di sangue raccolti, infatti, cinque risultarono positivi a test sierologici per MVS (ELISA per "competizione" e sieroneutralizzazione), ma successivi prelievi di controllo dagli animali presunti infetti e da altri capi presenti nell'allevamento diedero esito completamente negativo. Poiché la contemporanea sieroconversione negativa di un

tale numero di animali appariva un'eventualità estremamente improbabile, fu dunque sospettata una impropria e scorretta esecuzione dei prelievi di sangue. Venne pertanto avviata un indagine giudiziaria, nell'ambito della quale, ad un anno di distanza dai fatti, personale dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università di Torino fu incaricato di consulenza tecnica volta a determinare i genotipi dei campioni risultati originalmente positivi ai test per MVS. Occorre tenere in considerazione che, nel lasso di tempo trascorso, le cinque scrofe sospette erano state nel frattempo macellate e i campioni di sangue da esse prelevati con certezza, nell'ambito delle indagini sierologiche di controllo, erano andati completamente distrutti.

Materiali e metodi

Sono state analizzate cinque provette recanti le sigle "7", "8", "9", "11" e "12" contenenti campioni di siero congelato, residuato dai test sierologici precedentemente effettuati per MVS, in volumi compresi tra i 200 e i 750 ?l.
I campioni sono stati centrifugati per 30 min a 14.000 rpm e il pellet di cellule è stato estratto usando il kit Nucleo Mag 96 Blood (Macherey Nagel, Düren, Germania), consistente in una lisi cellulare con reagenti caotropici seguita da legame del DNA a microsfere magnetiche rivestite di silicio. La purificazione e l'eluzione degli acidi nucleici in un volume finale di 50 µl è stata eseguita utilizzando il separatore magnetico automatico King Fisher mL (Thermo Labsystems, Vantaa, Finlandia).
La presenza di DNA suino negli estratti è stata determinata mediante saggio di quantificazione assoluta su strumento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) utilizzando la combinazione dei seguenti primer e sonda TaqMan specifici per il gene della β-actina suina: primer forward 5'-TGTCCCGCAACTTGAAGTATGAAG; primer reverse 5'-TGCCTCCGCACCTCAAC; sonda 5'-CTTTTGGTCCCCCTAGGAGC marcata con fluoroforo FAM.
Aliquote di 5 ?l di ogni DNA estratto sono state amplificate con Animal Type Pig PCR Amplification kit (Biotype AG, Dresda, Germania), seguendo le raccomandazioni della casa produttrice. Le caratteristiche salienti degli 11 polimorfismi STR e di un locus Amelogenina-simile per la definizione di sesso inclusi in tale sistema di PCR multiplex sono mostrati nella Tabella 1. I prodotti fluorescenti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi capillare, utilizzando lo strumento ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), e la successiva genotipizzazione è stata effettuata tramite i software GeneScan 3.7 e Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).
Al fine di disporre di dati di genetica di popolazione da impiegare nel calcolo biostatistico, la distribuzione allelica degli STR inclusi nel sistema di PCR impiegato è stata determinata in un campione (n=55) di ibridi Landrace x Large White provenienti da allevamenti piemontesi. Il potere di discriminazione (PD) e la probabilità di esclusione (PE) derivante dalla combinazione degli undici marcatori STR sono stati calcolati secondo le formule proposte da Fisher et al. [2] e Ohno et al. [3], rispettivamente. La probabilità di associazione dei caratteri identici, nelle due distinte ipotesi di consanguineità e non consanguineità, è stata calcolata in base alle formule elaborate da Weir et

al. [4]. L'interpretazione di profili genetici misti mediante calcolo del rapporto di verosimiglianza è stato effettuato utilizzando un approccio combinatorio non ristretto, secondo le raccomandazioni della Società Internazionale di Genetica Forense, utilizzando le formule suggerite da Weir et al. [5,6]. Nei calcoli è stato impiegato un coefficiente di correzione per inincrocio nella popolazione (θ) pari a 0.2 [7].

Tab. 1. Caratteristiche dei loci polimorfici inclusi nel sistema di amplificazione Animal Type Pig PCR Amplification kit.
Tab. 1. *Characteristics of polymorphic loci included in the Animal Type Pig PCR Amplification kit.*

Locus	Posizione cromosomica	GenBank #	Intervallo allelico	Dimensioni degli ampliconi (bp)
SBH2	3p16-17	-	6-34	84-192
SBH18	16q23	-	9-23	214-271
SBH4	6q35	-	47.3-66.1	317-390
S0655	7p11	AJ251829	5-22	417-488
SBH23	X,Y	-	-	83 (Y) – 93 (X)
SBH20	18q13-23	-	19-49	136-254
SBH1	1p13	-	7-18	284-329
SBH10	9p11-13	-	31-50	364-440
SBH13	13q46-47	-	8-18	99-141
387A12F	12p14-15	AB059041	9-21 2	05-254
SBH22	Xp24	-	18-28	293-332
SBH19	17q12	-	10-16	387-411

Risultati

Tutti e cinque i campioni di siero sottoposti ad estrazione sono risultati contenere, in base alla reazione di quantificazione assoluta avente quale target il gene della β-actina, DNA genomico suino in quantità utile per lo studio di polimorfismi genetici, con concentrazioni variabili tra 0,13 e 0,38 ng/µl. Gli estratti di DNA hanno generato profili genetici, completi per i dodici marcatori esaminati e perfettamente riproducibili in successive repliche degli esperimenti di PCR, le cui caratteristiche sono riportate in Figura 1. E' possibile osservare come i sieri "7" e "11" presentassero un medesimo profilo STR. Basandosi sui dati di popolazione raccolti in questo studio e riportati in Tabella 2, la probabilità di associazione di caratteri identici (probabilità che un soggetto assunto a caso dalla popolazione possegga, per ragioni meramente casuali, un corredo genotipico identico a quello condiviso dalle due tracce in esame) per questi due campioni risultava pari a $1,6 \times 10^{-13}$; tanto esigua, in pratica, da risultare del tutto trascurabile. Tenendo in considerazione la possibilità che i due campioni con profilo genetico sovrapponibile potessero provenire anziché da un medesimo individuo da due animali imparentati, la probabilità di associazione dei caratteri identici aumentava, stante la più elevata probabilità di condividere alleli identici per discendenza oltre che per stato, pur rimanendo estremamente ridotta: $9,2 \times 10^{-6}$ (nell'ipotesi si trattasse di scrofe sorelle piene), $5,9 \times 10^{-10}$ (mezze sorelle) e $1,7 \times 10^{-11}$ (cugine prime).
I campioni "8", "9" e "12" mostravano invece profili misti (perfettamente sovrapponi-

bili nel caso di “8” e “9”), che includevano costantemente gli alleli caratteristici del profilo genetico dei campioni “7” e “11”. Il calcolo del rapporto di verosimiglianza indicava che i profili misti osservati erano 2,8 x 10^{13} (campioni “8” e “9”) e 9,9 x 10^{11} (campione 12) volte più verosimili data l’ipotesi che essi contenessero effettivamente il DNA di “7” e “11”, piuttosto che quello di due soggetti assunti a caso dalla popolazione la cui combinazione di alleli risultasse compatibile per ragioni casuali con il profilo genetico dei campioni “7” e “11”. In conclusione, i risultati ottenuti supportavano fortemente l’ipotesi che tutte le differenti provette contenessero, esclusivamente o in parte, il sangue proveniente da uno stesso “*singleton reactor*”.

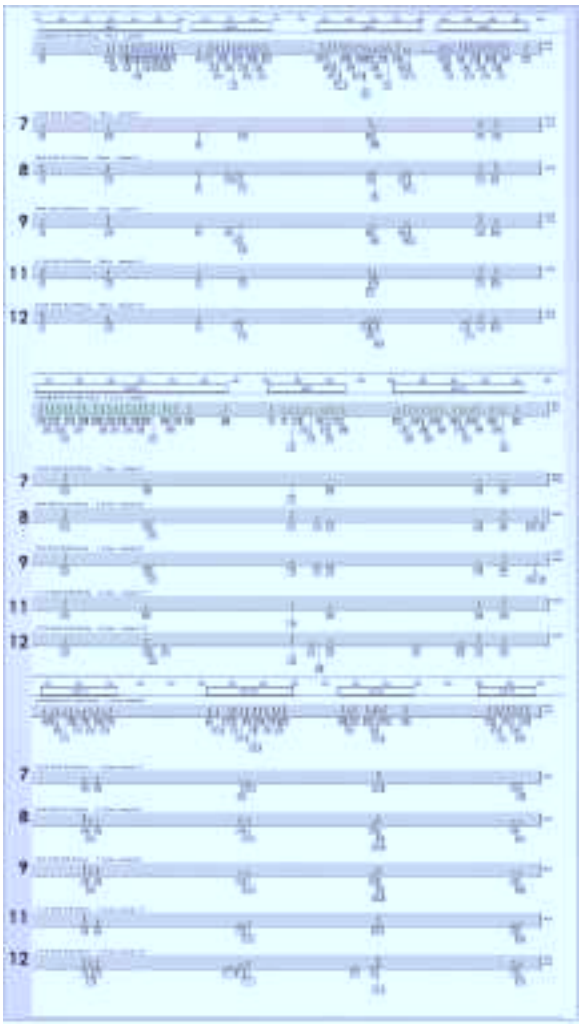


Fig. 1. Profili genetici d STR relativi ai cinque campioni di siero oggetto di indagine.
Fig. 1. *STR profiles of the five questioned serum samples.*

Tab. 2. Distribuzione delle frequenze alleliche degli STR inclusi in Animal Type Pig PCR amplification kit in un campione di popolazione (n=55) di scrofe ibride Landrace x Large White provenienti da allevamenti piemontesi.

Tab. 2. *Allele distribution of STR loci included in the Animal Type Pig PCR amplification kit in a population sample (n=55) of Landrace x Large White crossbred pigs from Piedmont farms.*

	SBH2	SBH18	S0655	SBH1	SBH13	387 A12F	SBH19	SBH22		SBH20	SBH10	SBH4
5			.091						19	.027		
6	.336								20	.318		
9		.036	.036		.273				22	.018		
10			.027	.009					23	.164		
11		.209	.300	.045			.082		23.3			
11.1						.045			24			
12		.100	.300	.064					28			
12.1						.109			29	.009		
13			.173	.255	.109	.145	.027		34	.009	.109	
14		.418	.027	.482	.036	.073	.327		35		.118	
14.1						.136			36	.164	.009	
15		.027			.418	.055	.291		37		.009	
15.1						.164			38	.027		
16		.064	.018	.145	.127		.273		39	.227	.009	
16.1						.027			40	.018		
17		.100	.018		.036				41		.073	
17.1						.036			42		.018	
18		.027	.009					.091	43	.018		
19		.009							44		.164	
19.1						.009			45		.027	
20								.245	46		.082	
21	.118					.136			48		.091	
22	.055	.009				.064		.045	49		.291	
23								.482	49.3			.009
23.3								.055	50.1			.045
24	.009							.073	56			.045
25	.009								56.1			.036
26	.336								57			.027
28	.009							.009	58			.364
30	.027								59			.018
34	.100								60			.218
									60.3			.036
									62			.045
									66			.073
									66.1			.082

Discussione

Nella recente letteratura scientifica sono state descritte diverse metodologie sviluppate per la tracciabilità genetica di suini, tra le quali l'analisi di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) [8] e STR dimerici [9]. Il sistema di PCR multiplex impiegato in questo studio si è dimostrato estremamente sensibile, consentendo la caratterizzazione di profili STR altamente informativi a partire da quantità estremamente ridotte di DNA (< 1 ng). Esso presentava un valore di PD complessivo (probabilità di riscontrare almeno una singola discrepanza allelica per i marcatori analizzati tra due soggetti

assunti a caso nella popolazione) >0.999999999 e di PE complessivo (dati i genotipi di una coppia madre-figlio, probabilità di un soggetto assunto a caso nella popolazione di essere escluso quale padre in base al proprio corredo allelico) pari a 0.99993, paragonabili a quelli riportati per i sistemi identificativi sopracitati. Occorre inoltre sottolineare che nelle indagini di genetica forense l'analisi di STR tetramerici offre significativi vantaggi rispetto ai marcatori dinucleotidici, tra i quali una più semplice tipizzazione (dovuta ad una minore incidenza di artefatti di PCR, quali i cosiddetti "*stutter peaks*") [10] e un minore tasso di mutazione in indagini genetiche di paternità [11]. Infine nelle situazioni in cui, come nel caso descritto, il materiale biologico da analizzare contenga una commistioni di più DNA, l'informatività di marcatori STR con elevata eterozigosità risulta superiore a quella di polimorfismi biallelici quali gli SNP [12].

Conclusioni

L'utilizzo di STR a fini di identificazione costituisce una metodica da tempo consolidata in genetica forense umana, caratterizzata da bassi costi e tempi d'analisi ed associata alla possibilità di elevato *throughput.* Il caso descritto ne dimostra chiaramente la potenziale utilità, oltre che nel settore della sicurezza alimentare (tracciabilità individuale delle carni), in quello della sorveglianza delle malattie infettive. Al fine di un'applicazione rigorosa di questa tecnica analitica, in relazione in particolare all'interpretazione biostatistica dei dati genetici, è tuttavia auspicabile in futuro l'acquisizione di sempre più dettagliate conoscenze riguardanti la distribuzione delle varianti alleliche dei polimorfismi impiegati e la definizione dei parametri di strutturazione genetica delle diverse popolazioni di suini, siano essi esemplari selvatici, razze pure o ibridi commerciali [13].

Bibliografia

Cunningham E.P., Meghen C.M. (2001) "Biological identification systems: genetic markers". Rev Sci Tech. 20, 491-499.

Fisher R.A. (1951) "Standard calculations for evaluating a blood-group system". Heredity. 5, 95–102.

Ohno Y., Sebetan I.M., Akaishi S. (1982) "A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles". Forensic Sci Int. 19, 93-98.

Weir B.S. (2003) "Forensics" in: Balding D.J., Bishop M, Cannings C. "Handbook of statistical genetics", 2ª ed., Hoboken, John Wiley & Sons, 830-852.

Gill P., Brenner C.H., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Schneider P.M., Weir B.S. (2006) "DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures". Forensic Sci Int. 160, 90-101.

Weir B.S., Triggs C., Starling L., Stowell L., Walsh K., Buckleton J. (1997) "Interpreting DNA mixtures". J. Forensic Sci. 47, 213–226.

SanCristobal M., Chevalet C., Haley C.S., Joosten R., Rattink A. P., Harlizius B., Groenen M.

A. M., Amigues Y., Boscher M.Y., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., Désautés C., Alderson L., Fimland E., Bagga M., Delgado J. V., Vega-Pla J. L., Martinez A. M., Ramos M., Glodek P., Meyer J. N., Gandini G. C., Matassino D., Plastow G. S., Siggens K. W., Laval G., Archibald A. L., Milan D., Hammond K., Cardellino R. (2006) "Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers". Anim Genet. 37, 189-198.

Rohrer G.A., Freking B.A., Nonneman D. (2007) "Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion". Anim Genet. 38, 253-258.

Nechtelberger D., Kaltwasser C., Stur I., Meyer J.N., Brem G., Mueller M., Mueller S. (2007) "DNA microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs". Anim Biotechnol. 12, 141-149.

Gill P., Kimpton C.P., Urquhart A, Oldroyd N., Millican E.S., Watson S.K., Downes T.J. (1995) "Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework—a strategy for the future. Electrophoresis". 16, 1543-1552.

Chakraborty R., Kimmel M., Stivers D.N., Davison L.J., Deka R. (1997) "Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci". Proc Natl Acad Sci USA. 94, 1041-1046.

Gill P. (2001) "An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes". Int J Legal Med. 114, 204–210.

Dawnay N. , Ogden R, Thorpe R.S., Pope L.C., Dawson D.A., McEwing R. (2008) "A forensic STR profiling system for the Eurasian badger: A framework for developing profiling systems for wildlife species". Forensic Sci Int Genet. 2, 47-53.

IMPIEGO DELLA BIOATTIVAZIONE PROGRAMMATA PER IL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ AMBIENTALE NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO DEL SUINO

PROGRAMMED BIOACTIVATION FOR THE IMPROVEMENT OF ENVIRONMENTAL QUALITY IN INTENSIVE PIG FARMING

VITTORIO SALA (*), CLAUDIA GUSMARA (*), LIVIA MOSCATI (°), PIERLORENZO BRIGNOLI & LUCA CABRINI (^)

(*) Università degli Studi di Milano – Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Malattie Infettive;

(°) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia;

(^) Eurovix s.r.l. – Cazzago S. Martino (BS)

Parole chiave: suinicoltura, bioattivazione, qualità ambientale.
Key words: pig farming, bioactivation, environmental quality.

Riassunto. Le prove di cui si riportano i risultati sono state condotte in un'azienda suinicola a ciclo chiuso completo di 1000 scrofe in produzione ed i trattamenti sono stati eseguiti con due bioattivatori, in polvere e soluzione, e un prodotto naturale di origine vegetale da aggiungere alla razione alimentare: la polvere è stata distribuita sulle pavimentazioni, la soluzione è stata aerosolizzata nell'ambiente di stabulazione mediante impianto computerizzato e l'integratore è stato invece aggiunto quotidianamente alla razione.
Il trattamento si è dimostrato facilmente gestibile, applicabile senza particolari problemi ed ha consentito un sensibile miglioramento della qualità dell'aria negli ambienti di allevamento. La riduzione della concentrazione ammoniacale, della circolazione di *M. hyopneumoniae* e salmonelle sono stati i risultati più evidenti dal punto di vista sanitario, insieme ad un miglioramento dei parametri dell'immunità aspecifica.

Summary. The present trial has been performed in a farrow-to-finish swine farm of 1000 sows. The bioactivation treatments have been performed using a dust and a solution product associated with a vegetable additive in the daily feed. Dust has been distributed on the floor while the solution has been aerosolized in the environment through a computerized plant. The treatment is easily managing and has allowed a perceptive improvement of the environmental air quality in the breeding units. The reduction of the air ammonia concentration and of the mycopalsmal and salmonellar infection have been the most evident sanitary results together the improvement of the aspecific immunity parameters.

Introduzione

Nella suinicoltura intensiva, i tradizionali interventi di controllo e prevenzione hanno perso parte della loro efficacia sulle perdite produttive derivate dalle sindromi polifat-

toriali; in queste condizioni, il recupero dello stato di "benessere" dell'animale nell'ambiente in cui vive, rappresenta spesso la sola strada percorribile.
Una valutazione evolutiva dello stato di benessere si può condurre attraverso la misurazione dei parametri funzionali del sistema immunitario non adattativo, che non interferisce solo sullo stato sanitario, ma anche sulla potenzialità produttiva e riproduttiva.
Nella qualità ambientale ha un ruolo decisivo quella dell'aria, soprattutto per quanto riguarda le emissioni ammoniacali, principalmente derivanti dall'azione della flora microbica di derivazione fecale sull'urea contenuta nelle urine; quest'ultima viene idrolizzata in CO_2 e NH_3, e in condizioni adatte (temperatura, umidità e pH alcalino) l'ammonio può liberarsi in forma ionica gassosa.
Un sistema relativamente innovativo per il miglioramento della qualità ambientale è la bioattivazione, che, attraverso l'impiego di miscele batterico-enzimatiche, consente di ridurre le emanazioni nell'aria dei biogas nocivi derivati dai liquami; l'evoluzione delle conoscenze degli ecosistemi batterici ha permesso di migliorarne l'applicazione pratica, modulando le interazioni tra le diverse popolazioni di microrganismi attraverso l'aggiunta di enzimi di origine batterica, batteri vivi o prodotti derivati da colture microbiche.
In queste condizioni, i microrganismi bioattivatori, grazie alla loro capacità competitiva nutrizionale nei confronti dei patogeni, sono in grado di restaurare i processi degradativi, riducendo al contempo la biodisponibilità della sostanza organica; i risultati più immediati ed evidenti sono la fluidità e il minor volume dei liquami prodotti, e la salubrità dell'ambiente di lavoro e allevamento.
I trattamenti si eseguono distribuendo bioattivatori in polvere sulle superfici calpestate dagli animali, oppure miscelandoli direttamente nei liquami, o ancora nebulizzandoli in forma liquida; i migliori risultati si ottengono associando con continuità le diverse forme di trattamento e potenziandole attraverso la somministrazione di integratori alimentari idonei a costituire un substrato favorevole ai microrganismi bioattivatori.

Materiali e metodi

Azienda e animali
Le prove di cui si riportano i primi dati sono state condotte in un'azienda suinicola a ciclo chiuso completo di 1000 scrofe in produzione, situata nel comprensorio bresciano; il ciclo è indirizzato all'allevamento del suino pesante tradizionale e si svolge in più siti, dei quali il principale è costituito da strutture di gestazione, sale parto, svezzamento e magronaggio. La rimonta è assicurata da un nucleo di scrofe GP, mantenute in una piccola azienda satellite; anche gli ingrassi sono esterni, ma ristallano unicamente lattoni di produzione aziendale. Piano vaccinale e programmazione delle medicazioni strategiche sono gestiti secondo i canoni tradizionali per questo tipo di produzione.
Lo screening diagnostico che ha preceduto la sperimentazione ha rilevato una situazione instabile attiva nei confronti di PRRSV, nonché la circolazione di batteri enteropatogeni nello svezzamento e di opportunisti respiratori nella fase di messa a terra; le forme cliniche di più frequente comparsa consistono, infatti, in episodi ricorrenti di enterotossiemia dello svezzamento e di malattia respiratoria nel magronaggio.

Trattamento
Nel corso delle verifiche sperimentali è stato applicato il sistema di bioattivazione Micropan® prodotto dalla ditta Eurovix, che comprende due bioattivatori (Micropan® polvere e Micropan® soluzione) e un prodotto naturale di origine vegetale (Biolife®) da aggiungere alla razione alimentare.
Micropan® polvere è stato distribuito sulle pavimentazioni, in ragione di 0,5 Kg per 100 mq ogni 15 giorni mediante spargimento manuale, mentre Micropan® soluzione è stato aerosolizzato nell'ambiente di stabulazione, mediante impianto computerizzato, in ragione di 1 litro ogni 100 mq al mese (3 irrorazioni giornaliere della durata di 20 secondi, previa diluizione in acqua alla concentrazione del 3-5%); Biolife è stato invece aggiunto quotidianamente alla razione, in ragione di 500 g/t di mangime.
Biolife® è un composto su base vegetale, ottenuto mediante processi di fermentazione controllata, che svolge una funzione di equilibratore organico attraverso il suo naturale contenuto in polisaccaridi, fattori enzimatici, vitaminici e aminoacidi essenziali, che migliorano il bilancio funzionale della microflora intestinale, prevengono la replicazione delle specie batteriche dannose e la formazione di tossine. Per di più, la migliore utilizzazione dei principi alimentari riduce l'emissione fecale di composti ammoniacali, come evidenti benefici sull'impatto ambientale e sull'inquinamento olfattivo.

Rilievi ambientali
È stata rilevata, con scadenza quadrimestrale, la concentrazione di ammoniaca (NH_3) applicando un metodo chimico (Drager – D), che prevede l'impiego di apposite fiale poste per un tempo prestabilito in punti fissi delle sale di stabulazione.

Prelievi ematici e tecniche diagnostiche
Alcuni gruppi di animali sono stati sottoposti a prelievi ematici a scadenza quadrimestrale per valutare l'evoluzione delle sieroprevalenze nei confronti di alcuni patogeni interferenti sulla produttività degli animali; il campione è stato così composto: 12 scrofe nullipare, 12 primipare, 12 secondipare, 12 tra terzipare e quartipare, 45 suinetti a fine svezzamento e 45 magroni a fine messa a terra.
I campioni ematici sono stati rapidamente portati in laboratorio, dove l'emosiero è stato estratto mediante centrifugazione, diviso in due aliquote di ugual volume e stoccato in congelatore fino al momento delle diagnosi; di queste, la prima è stata utilizzata per lo screening sieroepidemiologico, mentre la seconda è stata mantenuta per il profilo immunitario aspecifico.
Per le diagnosi sierologiche sono state applicate le procedure in uso presso il laboratorio di Patologia Infettiva del Suino della sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria; più in dettaglio, per le indagini sierologiche, che hanno riguardato *M. hyopneumoniae* e *Salmonella spp.* Sono stati utilizzati kit ELISA della linea HerdCheck di IDEXX Laboratories.
Per la valutazione dell'attività battericida, di quella complementare, per la titolazione del lisozima sierico e per la determinazione di ROMs e PAO (radicali liberi e potere antiossidante) sono state applicate le tecniche in uso presso il Laboratorio di Biochimi-

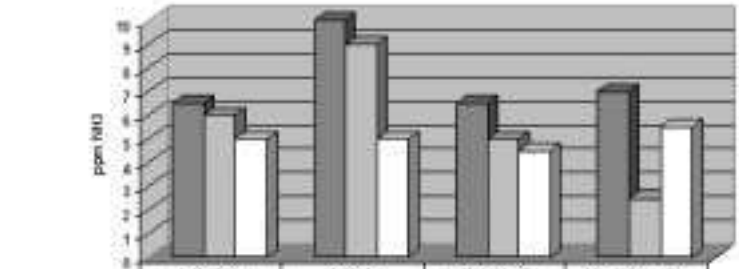
ca Clinica e Benessere Animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, che ha curato anche l'esecuzione pratica.

Risultati e considerazioni

Tra i numerosi risultati ad oggi ottenuti, sono oggetto di questa nota i rilievi relativi alla concentrazione di ammoniaca e la valutazione delle sieroprevalenze per micoplasmi e salmonelle, già valutate come indicative della qualità sanitaria dell'ambiente di allevamento; detti risultati sono stati organizzati negli schemi seguenti, cui si rimanda per un'analisi più dettagliata; considerando il carattere preliminare di questa relazione, per ogni ambito sono state sottolineate e brevemente commentate le evidenze pratiche più rilevanti.

Biogas ambientali (ammoniaca)
I rilievi quadrimestrali eseguiti finora hanno mostrato una riduzione progressiva e generalizzata della concentrazione di gas ammoniacale nei ricoveri sottoposti a trattamento con il sistema Micropan®; questi dati confermano quanto già verificato nelle prove già eseguite per il controllo del danno produttivo riportabile a *M. hyopneumoniae* nella fase d'ingrasso.
Nello specifico dell'azienda in prova, è possibile che il trattamento di bioattivazione abbia sortito effetti maggiori come conseguenza della prima applicazione ad un sistema ad elevata criticità; solo così possono trovare spiegazione le riduzioni assai consistenti della contaminazione ammoniacale riscontrate in tutte le fasi produttive, che hanno raggiunto soglie di dimezzamento nei locali a maggior criticità, come i ricoveri delle scrofette da rimonta o il magronaggio. In tutte le altre fasi, pur senza raggiungere questi livelli, la diminuzione è stata consistente e graduale.
Una particolare considerazione meritano i rilievi sull'ingrasso, che confermano, analogamente a quanto già osservato in altre situazioni controllate, il peggioramento della qualità dell'aria durante la stagione invernale, quando i ricambi sono ridotti per impedire il raffreddamento dei ricoveri.

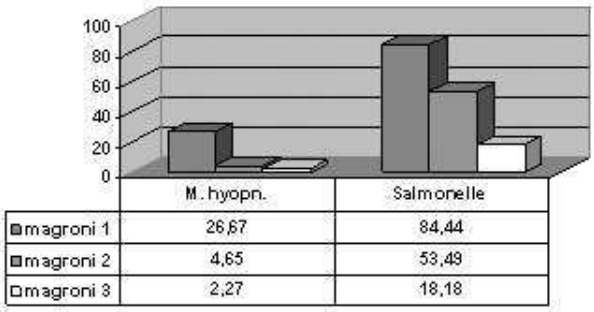
Livelli d'infezione (sieroprevalenze)
Le diagnosi sierologiche temporizzate, eseguite su campionamenti prestabiliti ed adattati alla realtà aziendale, rappresentano uno strumento epidemiologico veramente pratico per valutare i livelli di propagazione delle infezioni, soprattutto quando si applicano soluzioni di controllo e prevenzione; nel nostro caso, le stesse sono state eseguite a scadenza quadrimestrale sui magroni (per *M. hyopneumoniae* e salmonelle).
La riduzione della circolazione di *M. hyopneumoniae* e *Salmonella* spp., resa evidente dalle sierodiagnosi eseguite a fine magronaggio, vale a dire al termine della fase maggiormente critica dal punto di vista delle nuove infezioni; la progressiva riduzione delle sieroprevalenze, particolarmente evidente per salmonella, ma largamente accettabile anche per micoplasma, conferma, validandole ulteriormente, le indicazioni già ottenute nelle precedenti sperimentazioni.



	gestazione	rimonta	svezzamento	magronaggio
pre-trattamento	6,5	10	6,5	7
dopo 4 mesi	6	9	5	2,5
dopo 8 mesi	5	5	4,5	5,5

Tav. 1. Concentrazioni ammoniacali nell'aria ambientale delle diverse unità produttive.
Tab. 1. *Environmental air ammonia concentrations in the different pig units.*

Il rilievo e l'analisi economica dei dati zootecnici e produttivi, tuttora in corso, potrà rappresentare un ulteriore indicatore di convenienza riguardo all'effettiva utilità del trattamento di bioattivazione.



	M. hyopn.	Salmonelle
magroni 1	26,67	84,44
magroni 2	4,65	53,49
magroni 3	2,27	18,18

Tav. 2. Sieroprevalenze (ELISA) nei confronti di *M. hyopneumoniae* e *Salmonella* spp.
Tab. 2. *Seroprevalence (ELISA test) against* M. hyopneumoniae *and* Salmonella *spp.*

Reattività agli stimoli (immunità aspecifica)
Considerando le valutazioni relative all'immunità aspecifica, il trattamento con il sistema Micropan® ha fornito una gamma di risultati da interpretare con attenzione; in premessa, ci pare doveroso sottolineare che i parametri di riferimento attualmente in uso sono solo in parte indicativi, non avendo ancora considerato tutte le tipologie strutturali e manageriali in uso nel sistema suinicolo italiano: perciò, l'affidabilità delle indicazioni ottenute è destinata ad aumentare nel tempo.
Nel frattempo i rilievi possono essere ugualmente interpretati, valutando la loro variazione temporale, in correlazione con i parametri ambientali e le sieroprevalenze; nello specifico, il potere battericida del siero diminuisce se gli animali sono sottoposti ad un

eccessivo stimolo ambientale (cariche batteriche e/o infettanti) e perciò appare evidente il maggior rischio delle fasi di svezzamento, magronaggio e rimonta, confermato anche dai parametri ambientali e dalla sierologia.
L'attività complementare diminuisce in presenza di fattori stressanti, soprattutto quando sono continui (stress "cronico"); i valori rilevati, del resto comuni alla maggior parte delle realtà aziendali, indicano l'eccesso di stimolo cui sono sottoposti gli animali: tuttavia, soprattutto nelle scrofe è evidente l'aumento dei valori rilevati.
La concentrazione del lisozima indica lo stato funzionale del sistema monocitico-macrofagico, e perciò aumenta nel corso dei processi infiammatori; l'eccesso di stimolo infettante, del resto confermato dai rilievi sierologici, appare evidente nella produzione rispetto alla scrofaia, dove la reattività è, anzi, largamente accettabile, soprattutto nelle pluripare.
I ROMs (radicali liberi, metaboliti ossigeno-reattivi) aumentano in caso di alimentazione con fattori pro-ossidanti (micotossine, lipidi perossidati, fattori anti-vitaminici) o nel corso dei processi infiammatori (sono liberati in gran quantità dalle cellule della serie bianca) e compromettono l'attività delle cellule del sistema immunitario; la situazione dell'azienda in esame appare accettabile, fatto salvo un peggioramento in occasione del terzo rilievo, su cui sono in corso accertamenti mirati.
Parallelamente, il PAO (potere anti-ossidante) fa riferimento a sostanze presenti nell'organismo per bilanciare l'eccesso di radicali liberi ed il suo andamento va analizzato contestualmente a questi ultimi.

Tav. 3. Parametri dell'immunità aspecifica (evoluzione temporale).
Tab. 3. *Timing of aspecific immunity parameters.*

	Riferimento	Battericidia > 40%	Lisozima 1-3µg/ml	Complemento >80 CH50 H_2O_2	ROMs 25.6 ±1 mmol	PAO 471±13µM HCLO neutralizzate
Scrofette	pre-trattamento	19,543	4,779	43,653	40,624	323,900
	dopo 4 mesi	25,342	1,597	34,783	49,417	279,542
	dopo 8 mesi	10,927	6,667	61,970	69,787	284,899
1° parto	pre-trattamento	27,399	2,370	20,882	41,265	214,692
	dopo 4 mesi	40,517	1,353	27,467	42,808	283,783
	dopo 8 mesi	36,580	3,314	40,680	72,295	306,271
2° parto	pre-trattamento	28,498	2,110	26,019	39,038	308,058
	dopo 4 mesi	42,317	1,317	27,842	42,367	291,425
	dopo 8 mesi	39,720	3,008	38,590	68,174	304,071
3°- 4° parto	pre-trattamento	28,607	1,692	24,870	39,390	317,564
	dopo 4 mesi	44,617	1,317	29,092	42,483	300,925
	dopo 8 mesi	37,196	2,772	31,780	63,732	307,043
Svezzati	pre-trattamento	8,014	7,856	24,415	42,756	309,741
	dopo 4 mesi	29,400	3,655	21,300	49,955	319,753
	dopo 8 mesi	13,559	7,079	21,526	48,951	306,578
Magroni	pre-trattamento	4,592	5,436	29,167	40,406	281,478
	dopo 4 mesi	28,422	5,041	44,065	45,791	278,716
	dopo 8 mesi	14,960	7,449	32,202	74,500	281,119

Conclusioni

Mentre il lavoro di sperimentazione prosegue (sono previsti altri due anni di rilievi) ci pare di poter proporre alcune osservazioni, che al momento sono giustificate dai dati sperimentali, ma potrebbero essere meglio precisate in futuro:
Il trattamento con il sistema Micropan® appare facilmente gestibile, applicabile senza particolari problemi e ben accetto dal personale aziendale, che beneficia, nell'immediato e sul lungo periodo, del miglioramento della qualità dell'aria nell'ambiente di lavoro; pur in un momento critico per l'economia del settore, i benefici ottenibili in ambito sanitario e produttivo possono inoltre essere vantaggiosi per l'azienda.
I risultati fin qui ottenuti confermano, ulteriormente validandolo, quanto già osservato e pubblicato in precedenza; la riduzione delle cariche batteriche ambientali è conseguenza dell'efficacia dei bioattivatori sull'ecosistema batterico ambientale, e si correla con la diminuzione della polluzione ammoniacale; quest'ultimo aspetto è rilevante rispetto al benessere, soprattutto respiratorio, degli animali in condizioni di affollamento.
I risultati fin qui ottenuti sembrano migliori nelle scrofe, verosimilmente perché questi animali sono in grado di beneficiare più a lungo della miglior qualità ambientale, in rapporto ad una permanenza più prolungata in azienda; per confermare questa indicazione, è lecito attendersi un progressivo miglioramento dei risultati anche nella produzione, in corrispondenza con il succedersi di cicli nei locali bioattivati.

Bibliografia

Beskow P., Norqvist M. & Wallgren P. (1998). "Relationships between selected climatic factors in fattening units and their influence on the development of respiratory diseases in swine". Acta Veterinaria Scandinavica 39 (1), 49-60.

Chang C.W., Chung H., Huang C.F. & Su J.J. (2001). "Exposure of Workers to Airborne Microorganisms in Open-Air Swine Houses". Appl. Env. Microbiol. 67 (1),155-161.

Done S. H., Chennells D. J., Gresham A. C., Williamson S., Hunt B., Taylor L. L., Bland V., Jones P., Armstrong D., White R. P., Demmers T. G., Teer N. & Wathes C. M. (2005). "Clinical and pathological responses of weaned pigs to atmospheric ammonia and dust". Vet. Rec.157, 71 – 80.

Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Ostanello F. & Sala V (2006). "Correlation between severity of Mycoplasma hyopneumoniae lung lesions and carcass quality in Italian heavy weight pigs". 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, Copenhagen, July 16–19 2006, 217.

Merril L. & Halverson L. J. (2002). "Seasonal Variation in Microbial Communities and Organic Malodor Indicator Compound Concentration in Various Types of Swine Manure Storage Systems". Journal Environ. Qual. 31, 2074 – 2085.

Möller H., Sommer S. & Ahring K. (2004). "Biological degradation and greenhouse gas emission during pre storage of liquid animal manure". J. Environ. Qual". 33 , 27 – 36.

Moscati L., Sensi M., Pela M., & Battistacci L. (2006). "Acute phase proteins and no specific immunity parameters". 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, Copenhagen, July 16–19 2006, 283.

O'Shaughnessy P. T., Achutan C. & Karsten A. W. (2002). "Temporal Variation of Indoor Air Quality in an Enclosed Swine Confinement Building". Journal of Agricultural Safety and Health 8 (4), 349 – 364.

Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G. & Sala V. (2007). "Pneumonia Disease Assessment using a Slaughterhouse Lung-Scoring Method". J. Vet. Med. A 54, 70–75.

Panetta D. M., Powers W. J. & Lorimor J. C. (2005). "Management Strategy Impacts on Ammonia Volatilization from Swine Manure. J. Environ. Qual". 34, 1119 – 1130.

Sala V. & Brignoli P. (2006). "Bioattivazione e qualità ambiente nell'allevamento del suino". Summa Animali da Reddito 5, 41-44.

Sala V. & Brignoli P. (2006). "Organizzazione e verifica di un programma integrato di tutela ambientale nella prevenzione delle sindromi polifattoriali del suino. Nota preliminare". XXXII Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, Modena 23-24 Marzo 2006, 353-356.

Sala V., Gusmara C., Ostanello F., Brignoli P. & Moscati L. (2007). "Impiego di un programma integrato di bioattivazione per il controllo della polmonite micoplasmica del suino". Large Animal Review 13, 1-6.

Sensi M., Moscati L., Timi M. & Battistacci L. (2006). "Evaluation of non specific immunity parameters as prognostic and diagnostic tool in swine pathology: a case reporting". 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, Copenhagen, July 16–19 2006, 287.

Sutton A.L., Kephart K.B., Verstegen M.W.A., Canh T. T.& Hobbs P. J. (1999). "Potential for Reduction of Odorous Compounds in Swine Manure Through Diet Modification". J. Anim. Sci. 77,430–439

Velthof G.L., Nelemans A., Oenema O & Kuikman P.J. (2005). "Gaseous Nitrogen and Carbon Losses from Pig Manure Derived from Different Diets". J. Environ. Qual. 34, 698–706.

ARRICCHIMENTO AMBIENTALE PER SUINETTI IN SALA PARTO

ENVIRONMENTAL ENRICHMENT FOR PIGLETS IN FARROWING ROOM

LORELLA GIULIOTTI [(1)], GIACOMO ORLANDINI [(2)], JACOPO GORACCI [(2)], M. NOVELLA BENVENUTI [(1)], ATTICCIATI FABIO [(3)]
[(1)] Dip. Produzioni Animali, Università di Pisa; [(2)] Collaboratore esterno; [(3)] Medico Veterinario, Filozoo, Carpi

Parole chiave: suinetti, arricchimento ambientale, gabbia parto, accrescimento.
Key words: piglets, environmental enrichment, farrowing crate, growing rate.

Riassunto. L'ambiente di allevamento condiziona lo stato di benessere degli animali in tutte le fasi della vita e in particolare nei soggetti giovani in quanto influisce sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e sul comportamento: è stato ormai dimostrato infatti che la presenza di un materiale manipolabile possa limitare i fenomeni di aggressività verso gli altri animali.
Il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare l'effetto di interventi di miglioramento ambientale sul benessere animale attraverso il monitoraggio delle *performance* produttive nel periodo precedente allo svezzamento dei suinetti.
La prova è stata condotta su 1186 animali. In una prima fase (Tesi 1) 443 suinetti sono stati suddivisi in due gruppi: quello *"Sperimentale"* mantenuto, dal terzo giorno di vita allo svezzamento, in ambiente arricchito con carta; il "*Controllo*" allevato su pavimento grigliato in plastica. I rimanenti 743 suinetti (Tesi 2) sono stati divisi in due gruppi, "*Controllo*" e *"Sperimentale"*, al quale, in corrispondenza del terzo giorno di vita e della prima pesata, sono state tolte le sbarre divisorie tra gabbie parto adiacenti. Tutti gli animali sono stati inoltre pesati a metà ciclo (14 giorni) e allo svezzamento (28 giorni). Dalla Tesi 1 non sono scaturite differenze significative tra i due gruppi, mentre i soggetti del gruppo *"Sperimentale"* della Tesi 2 hanno evidenziato allo svezzamento pesi (7593 g *vs* 7216 g) e incrementi ponderali (232 g *vs* 223 g) significativamente superiori.

Abstract. Farm environment considerably affects animal welfare on the whole but mainly in the first period of their life, influencing the development of central nervous system and consequently of the normal pattern behaviour.
Several studies suggest that environmental enrichment, especially the provision of handling material, reduces behaviours directed at conspecifics with positive effect on animal welfare, allowing the creation of behavioural opportunities to express control over the environment.
The aim of the present study was to estimate the effect of environmental enrichment on animal welfare monitoring productive performances.
The experiment was carried out on 1186 piglets in two successive batches. Thesis 1 explored the efficacy of providing piglets paper as handling material on their growing rate. Moreover it was investigated on the effect of the partition between three neigh-

bouring farrowing crates removal (Thesis 2) on piglets performances. Animals were weighed at 3th, 14th, and 28th day after birth.
Results of the first Thesis, showed no significance differences between the two groups. On the contrary, piglets kept in open creates displayed better growth and average daily gain since the 14th day after birth·

Introduzione

La presenza permanente di sufficiente materiale che permetta ai suini di esplicare attività di esplorazione e manipolazione è stata messa in evidenza dalle recenti normative europee inerenti al benessere animale (2001/88/CE, 2001/93/CE) in quanto la ridotta espressione del repertorio comportamentale rappresenta una importante fonte di stress. L'importanza dell'arricchimento ambientale è stata dimostrata da diversi studi (Grandin, 1989; Petersen e coll., 1995; Beattie e coll., 2000; Ventura, 2003; Hotzel e coll., 2004) che hanno evidenziato come il comportamento dei suinetti possa degenerare in atteggiamenti aggressivi e dannosi verso conspecifici in ambienti ipostimolanti. L'assenza di sollecitazioni ambientali determina infatti vincoli allo sviluppo e all'espressione dei normali comportamenti specie-specifici, influenzando le attività comportamentali e deviandole verso altri animali (Bolhuis e coll., 2005).
In altre indagini sono state sperimentate forme di arricchimento in sala parto con materiali di origine diversa come pietre, trucioli, paglia, corda, etc., compatibilmente con le caratteristiche strutturali dell'azienda (Grandin e coll., 1983; Grandin 1988; Wood-Gush e coll., 1990; Petersen e coll. 1995; Zonderland e coll., 2001; Lewis e coll., 2005;). Tra i vari arricchimenti ambientali utilizzati, i suini sembrano preferire quelli masticabili, distruttibili e deformabili (Bolhuis e coll., 2005). Dall'osservazione diretta e quotidiana degli animali Wemelsfelder e coll. (2000) hanno rilevato come questi interagissero con il substrato, trasportandolo all'interno del box, grufolando e soddisfacendo la loro innata curiosità. In condizioni di allevamento semi-brado infatti i suini passano la maggior parte del tempo in comportamenti esplorativi, limitando le attività eterodirette (Bolhuis e coll., 2005). Alcuni studi hanno dimostrato che anche l'attività ludica, assicurata attraverso l'inserimento di oggetti di diversa natura nell'ambiente (palloni, catene, ruote) riveste un ruolo importante nel miglioramento del benessere animale (Ventura, 2003) e in altri studi (Bolhuis e coll., 2005) è stata evidenziata la riduzione di comportamenti aggressivi verso i conspecifici con l'incremento di attività esplorative e ludiche.
Petersen e coll. (1995) hanno dimostrato che i suinetti indirizzano verso la scrofa il 39% delle attività qualora non siano presenti forme di arricchimento, contro il 22% in presenza di stimoli ambientali.
Anche Grandin (1987, 1988, 1989) e coll. (1983, 1986) (alcuni sono solo Grandin, altri Grandin e Coll.) hanno documentato come un ambiente arricchito possa contribuire a ridurre l'eccitabilità e l'aggressività. E' stato anche dimostrato che gli animali allevati in ambiente arricchito non mostrano comportamenti timorosi in seguito all'aggiunta di oggetti sconosciuti (Wemelsfelder e coll., 2000). Alcuni Autori (Kanaan e coll., 2007) hanno studiato la possibilità di apportare miglioramenti ambientali con semplici inter-

venti sulle strutture delle gabbie parto (rimozione delle barre laterali) ampliando le interazioni sociali tra più nidiate.
Il presente lavoro ha avuto lo scopo di verificare gli effetti dell'arricchimento ambientale nella prima fase di vita dei suinetti attraverso l'osservazione di alcuni parametri produttivi quali indicatori del benessere animale.

Materiali e Metodi

La prova è stata condotta presso un'azienda a ciclo chiuso situata in provincia di Pisa su un totale di 1186 suinetti; in una prima fase (Tesi 1) 443 suinetti provenienti da 47 nidiate sono stati casualmente suddivisi in due gruppi omogenei per peso, sesso e consistenza: quello *"Sperimentale"* mantenuto, dal terzo giorno di vita fino allo svezzamento in gabbie parto arricchite con carta (Grandin e coll., 1983; Lewis e coll., 2005); il "*Controllo*" allevato nelle gabbie parto normalmente presenti in azienda provviste di pavimento grigliato in plastica. La carta, tagliata in strisce di 12x3 cm, è stata distribuita e rimossa dai nidi quotidianamente. La scelta del materiale per l'arricchimento è stata suggerita dalla facile reperibilità a livello aziendale, dalla praticità d'uso e dalla sua innocuità (assenza di inchiostro). La quantità distribuita è stata scelta in modo da evitare problemi di intasamento delle fognature e comunque sufficiente a coprire uniformemente il nido.
Nella Tesi 2 i rimanenti 743 suinetti provenienti da 70 nidiate sono stati divisi in due gruppi omogenei: quello di "*Controllo*" mantenuto come il precedente nelle condizioni normali e uno *"Sperimentale"* nel quale, in corrispondenza del terzo giorno di vita, sono state tolte le sbarre divisorie a tre gabbie parto adiacenti in modo da assicurare ai suinetti una maggiore libertà di movimento e interazioni sociali oltre che possibilità di accesso a più scrofe grazie all'unione delle tre nidiate.
Per tutti gli animali la prova è iniziata in corrispondenza del terzo giorno di vita (Peso 1) quando sono stati pesati mediante bilancia elettronica e identificati con marca auricolare; l'avvio dell'indagine non è stato anticipato per evitare uno stress eccessivo alla scrofa e alla nidiata. Le pesate successive sono avvenute a metà ciclo (Peso 2: 14 giorni) e allo svezzamento (Peso 3: 28 giorni). Quotidianamente sono stati registrati i dati relativi alla mortalità e i casi di lesioni conseguenti a fenomeni di aggressività.
Per valutare gli accrescimenti e gli incrementi ponderali, per ciascuna delle due tesi il modello statistico utilizzato ha considerato come fattori fissi l'arricchimento ambientale e il sesso. Il peso dei suinetti alla 2° e 3° pesata è stato covariato con il peso ad inizio prova. L'elaborazione statistica è stata effettuata mediante software JMP, ver. 5.0.1 del S.A.S. Institute (2002).

Risultati e Discussione

Tesi 1
Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi, infatti il gruppo *"Sperimen-*

tale" ha fatto registrare pesi medi e incrementi ponderali sovrapponibili a quelli del *"Controllo"* (Tab. 1).

Tab. 1. Andamento del peso medio e dell'incremento ponderale degli animali della Tesi 1.
Tab. 1. *Average live weight and daily gain during Thesis 1.*

		Controllo-*Control*		Sperimentale-*Experimental*		
		Media *Mean*	Err. Std *Std. Err.*	Media *Mean*	Err. Std *Std. Err.*	p
n.		208		191		
Peso 1-Weight 1	g	2014	26.61	2005	27.76	0.845
Peso 2-Weight 2	g	4669	60.76	4697	63.38	0.727
Peso 3-Weight 3	g	7693	93.64	7703	97.68	0.928
IMG-ADG g		239.8	3.48	238.5	3.63	0.793

La disponibilità di un substrato manipolabile non sembra quindi aver prodotto vantaggi in termini di accrescimenti. La quantità di carta usata è, tuttavia, sembrata sufficiente a stimolare l'attività di esplorazione e di gioco dei suinetti (Fig. 1), che si mostravano incuriositi fin dalle operazioni di aggiunta o sostituzione della carta.

Fig. 1. Gabbia parto arricchita con carta
Fig. 1. *Farrowing crate enriched with paper.*

Il peso dei maschi è risultato sempre più elevato rispetto a quello delle femmine (7828 g *vs* 7567 g allo svezzamento) con differenze al limite della significatività (p=0.054), indicando che la castrazione non ha rappresentato uno stress tale da compromettere la loro evoluzione ponderale.
I soggetti eliminati nel corso di questa Tesi sono stati 44, uniformemente distribuiti tra i due gruppi; di questi 8 sono morti e 36 scartati a seguito di precarie condizioni sanitarie.

Tesi 2

I soggetti del gruppo "Sperimentale" hanno evidenziato differenze significative nei pesi ($p<0,001$) e negli incrementi ponderali ($p<0,05$) rispetto al gruppo di "Controllo" (Tab. 2). Già al momento della seconda pesata, infatti, i soggetti del gruppo "Sperimentale" hanno registrato pesi medi significativamente superiori rispetto al "Controllo" (4295 *vs* 4142) e al momento dello svezzamento la differenza di peso tra i due gruppi ha raggiunto circa 380 g a favore del gruppo allevato nelle gabbie private delle sbarre divisorie.

Non sono state osservate differenze significative tra i sessi con incrementi ponderali giornalieri del tutto simili (227 g).

Tab. 2. Andamento del peso medio e dell'incremento ponderale (g) degli animali della Tesi 2.
Tab. 2. *Average live weight and daily gain during Thesis 2.*

		Controllo-*Control*		Sperimentale-*Experimental*		
		Media *Mean*	Err. Std *Std. Err.*	Media *Mean*	Err. Std *Std. Err.*	p
n.		338		332		
Peso 1-Weight 1	g	1792	19.63	1784	19.83	0.8120
Peso 2-Weight 2	g	4142	34.23	4295	34.57	0.0010
Peso 3-Weight 3	g	7216	61.64	7593	62.26	0.0001
IMG-ADG	g	223.0	2.46	232.0	2.48	0.0070

L'accorgimento adottato nelle gabbie parto "sperimentali" ha consentito ai soggetti di usufruire di una maggiore libertà di movimento e migliori interazioni sociali per l'aumentato contatto tra con specifici, nonché di poter accedere a tre scrofe (Fig. 2).

Fig. 2. Gabbia parto modificata
Fig. 2. *Modified farrowing crate.*

Durante il periodo sperimentale il numero dei soggetti eliminati (11 morti e 53 scarti) è stato simile nei due gruppi.
In ambedue le tesi la mortalità è stata contenuta entro la soglia del 10-15 %, ritenuta accettabile per questa fase (Bertacchini e Campani, 2001). Sono stati osservati inoltre casi di diarrea e lesioni dovute a consueti fenomeni di aggressività tra i soggetti; tuttavia questi episodi si sono mantenuti entro i limiti della normalità durante l'intero ciclo e sovrapponibili nei gruppi sperimentali e di controllo.

Conclusioni

L'aggiunta della carta come substrato manipolabile nella gabbia parto non ha determinato alcun beneficio in termini di accrescimenti. Il breve tempo che intercorre tra la nascita e lo svezzamento non è stato probabilmente sufficiente per evidenziare eventuali benefici. Anche la limitata quantità di substrato utilizzato, imposta dalle condizioni strutturali dell'impianto di smaltimento, potrebbe aver condizionato l'esito della prova.
L'eliminazione delle sbarre divisorie tra le gabbie ha prodotto miglioramenti significativi delle *performance* zootecniche dei suinetti che hanno beneficiato delle diverse condizioni microambientali (spazio, interazioni sociali, possibilità di accesso a più scrofe).
Il tasso di mortalità e il numero di lesioni conseguenti a fenomeni di aggressività si sono mantenuti nella norma e senza variazioni tra i diversi gruppi.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Azienda Agricola Stassano per la fattiva collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- Beattie V.E., O'Connell N.E., Moss B.V. (2000) "Influence of environmental enrichment on the behaviour, performance and meat quality of domestic pigs". Livest. Prod. Sci., 65: 71-79.
- Bertacchini F. e Campani I. (2001) "Manuale di allevamento suino". Edagricole, Bologna.
- Bolhuis J.E., Schouten W.G.P., Schrama J.W., Wiegant V.M., (2005) "Behavioural development of pigs with different coping characteristics in barren and substrate-enriched housing conditions". Appl. Anim. Behav. Sci.: 93: 213-228.
- Grandin T., Curtis S.E., Greenough W.T. (1983) "Effects of rearing environment on the behaviour of young pigs". Journal of Animal Science, 57 (Suppl. I): 137.
- Grandin T., Taylor I.A., Curtis S.E., Carr T.R. (1986). "Richness of pig's environment affects handling in chute". Journal of Animal Science, 63 (Suppl. I): 161.
- Grandin T. (1987) "Toys, mingling and driving reduce exitability in pigs". Journal of Animal Science, 65 Supplement I: 230-231.
- Grandin T. (1988) "Environmental enrichment for confinementpigs". Livestock Conservation

Institute, Annual Meeting Proceedings, Bowling Green, Kentucky: 119-123.
- Grandin T. (1989) “Effect of rearing environment and environmental enrichment on the behaviour of neural development of young pigs”. Doctoral Dissertation University of Illinois.
- Hotzel M.J., Machado L.C.P., Wolf F.M., Dalla Costa O.A., (2004) “Behaviour of sows and piglets reared in intensive outdoor or indoor systems”. Appl. Anim. Behav. Sci. 86: 27-39.
- Kanaan V. T., Pajor E. A., Lei D. C. Jr., Richert B. T., Garner J: P., (2007) “A note on the effects of co-mingling piglet litters on pre-weaning growth, injures and responses to behavioural tests”. Appl. Anim. Behav. Sci. In Press.
- JMP (2002) J.M.P. User’s Guide ver. 5.0, S.A.S. Institute Inc. Ed. Cary (NC), USA.
- Kranendonk G. (2006) “Prenatl stress in pigs”, Universiteit Utrecht.
- Lewis E., Boyle L.A., O’Doherty J.V., Lynch P.B., Brophy P. (2005) “The effect of providing paper or ropes to piglets in farrowing crates on their behaviour and health and the behaviour and health of their dams”. Appl. Anim. Behav. Sci.: 96: 1-17.
- Petersen V., Simonsen H.B., Lawson L.G. (1995) “The effect of environmental stimulation on the development of behaviour in pigs”. Appl. Anim. Behav. Sci., 45: 215-224.
- Ventura P. G. (2000) “Scale in aiuto del benessere dei suini”. L’informatore Agrario, 16: 93-94.
- Ventura P. G. (2003) “Anche i giochi in aiuto del benessere dei suini”. L’informatore Agrario, 15: 95-96.
- Wemelsfelder F., Haskell M., Mendl, M.T., Calvert S., Lawrence A.B. (2000) “Diversity of behaviour during novel object tests is reduced in pigs housed in substrate-impoverished conditions”. Anim. Behav., 60: 385-394.
- Wood-Gush D.G.M., Vestergaard K., Petersen H.V. (1990) “The significance of motivation and environment in the development of exploration in pigs”. Biol. Behav., 15: 39-52.
- Zonderland J.J., Vermeer H.M., ter Avest A., Vereijken P.F.G., Spoolder H.A.M. (2001) “Measuring a pig’s preference for suspended toys by using an automated recording device”. CIGR Conference, Technical University of Zielona Gòra, Podgròrna.

VALUTAZIONE DELL'APPLICAZIONE DELLE MISURE DI BIOSICUREZZA IN ALLEVAMENTI SUINI ALL'INGRASSO E CORRELAZIONE CON DATI PRODUTTIVI

VALUATION OF BIOSECURITY LEVELS IN FATTENING PIG HERDS AND RESPECTIVE CORRELATION ON PRODUCTIVITY DATA

TARANTOLA M*. MARTANO G.**, ZANCANARO G***, FANTINI I*. & FERENAZ I*

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia. Università degli Studi di Torino;* **Veterinario Dirigente Asl To3; Piemonte; * *Dipartimento di Patologia Animale. Università degli Studi di Torino*

Parole chiave: suini all'ingrasso, biosicurezza, performance zootecniche.
Key words: swine fattening, biosecurity, productive traits.

Riassunto. Scopo di questo studio è stato quello di verificare le condizioni di biosicurezza, interna ed esterna, in 41 allevamenti suini da ingrasso localizzati nelle province di Cuneo e Torino e verificare eventuali correlazioni con alcuni parametri produttivi (percentuale di mortalità e la percentuale di suini "scarti"). Per la raccolta dati si è utilizzato un questionario suddiviso in diverse sezioni, per un totale di 42 variabili inerenti alla biosicurezza interna, esterna, alimentazione e trattamenti sanitari.
Per ogni variabile è stata valutata l'influenza sui parametri produttivi attraverso il confronto delle mediane: confronto grafico della distribuzione dei dati (boxplot) e Kruskal-Wallis test.
La percentuale dei morti è risultata inferiore nel caso in cui sono stati utilizzati materiale ad uso esclusivo (torcinaso, marchi auricolari..) ($p < 0.05$); se il deposito carcasse dei morti era isolato ($p<0.05$) e infine se erano presenti reti-anti insetti alla finestre ($p< 0.05$).
Interessante notare, infine, che se anche non statisticamente significativa, la linea di tendenza che indica una possibile correlazione tra l'aumento di numero di capi per addetto, la presenza di un organigramma e la percentuale di mortalità e di scarti.
Questi dati preliminari verranno integrati con ulteriori parametri riguardanti il benessere dei suini allevati, utilizzando le check list relative alla normativa 91/630/CEE.

Abstract. The aim of this study is to evaluate the biosecurity level of 41 swine fattening herds located in Torino and Cuneo provinces and to survey some productivity parameters (mortality rate and chronic sick pigs rate).
In order to collect data it has been used a questionnaire divided in different sections for a total of 42 items regarding internal and external biosecurity, feeding and sanitary treatments.
For each item it has been evaluated the impact on the productivity parameters through

the comparison of the medians: graphic comparison of the data distribution (boxplot) and Kruskal-Wallis test.
The mortality rate has been founded lower in case of use of exclusive equipment (barnacles and ear brands..) ($p<0.05$); also in case the deaths store was insulated ($p<0.05$) and in case insect screen for windows have been installed ($p<0.05$).
It is very important to underline the correlation trend between the increase of pig numbers for workers, the organization chart available and the mortality rate.
These preliminary data will be completed with further parameters regarding welfare, using check list following the 91/630/CE law.

INTRODUZIONE

La biosicurezza è una parte integrante in qualsiasi azienda di produzione di suini (Pinto C. J. Et al, 2003). Il libro bianco sulla sicurezza alimentare, tutta la normativa dell'Unione Europea (UE), già approvata od in fase di approvazione, riconosce che i rischi biologici e chimici, inerenti ai prodotti alimentari, possono avere origine a livello di produzione primaria. Per conseguire il livello igienico-sanitario richiesto, l'UE propone che, già a livello di azienda agricola, si elabori una strategia basata sull'analisi dei rischi e sulla predisposizione di efficaci metodi di controllo. Gli allevatori sono consapevoli che le misure di biosicurezza sono di fondamentale importanza per prevenire le patologie e aumentare la redditività dell'allevamento, ma spesso non seguono correttamente le procedure. Nonostante ci siano diversi manuali di biosicurezza, sono scarsi i dati inerenti le misure realmente attuate nelle aziende suinicole (Sona B. *et al*; Boklund A. *et al*; Casal J. *et al*), e le loro possibili correlazioni con le performance zootecniche. Obiettivo quindi di questo studio è stato quello di indagare le misure di biosicurezza adottate in un campione di aziende e la loro correlazione alcuni parametri produttivi.

MATERIALI E METODI

Sono stati visitati 41 allevamenti suini all'ingrasso localizzati nelle province di Cuneo e Torino, per un totale di 51.000 capi. Per ogni allevamento è stata compilata una scheda in cui venivano descritte le norme di biosicurezza interna ed esterna, l'alimentazione e trattamenti sanitari, nonché le performance zootecniche quali la percentuale di mortalità e la percentuale di suini "scarti". Per ogni variabile è stata valutata l'influenza sui parametri produttivi attraverso il confronto delle mediane: confronto grafico della distribuzione dei dati (boxplot) e Kruskal-Wallis test (R Development Core Team (2007). E' stata quindi calcolata la prevalenza di risposte negative alle domande relative ad alcuni componenti di biosicurezza.

RISULTATI

La percentuale dei morti è risultata inferiore nelle aziende in cui venivano utilizzati materiale ad uso esclusivo (torcinaso, marchi auricolari..) ($p < 0.05$), grafico 1; se il deposito carcasse dei morti era isolato ($p<0.05$) grafico 2 e infine se erano presenti reti-anti insetti alla finestre ($p< 0.05$) grafico 3.

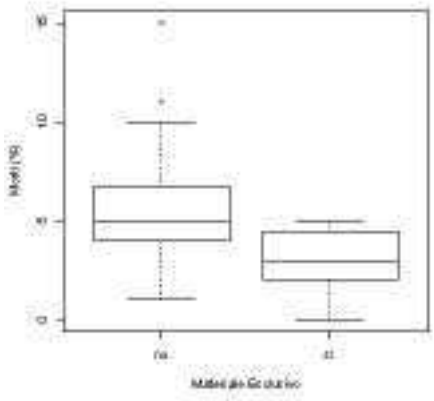


Fig. 1. Boxplot relativo all'utilizzo del materiale ad uso esclusivo.
Fig. 1. *Box-plot presentations use of exclusive equipment.*
Kruskal-Wallis chi-squared = 4.8447, df = 1, p-value = 0.02773 (p < 0.05)

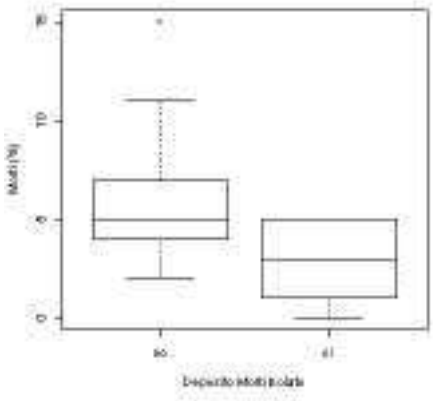


Fig. 2. Box-plot relativo al deposito della carcasse morti.
Fig. 2. *Box-plot presentations of deaths store.*
Kruskal-Wallis chi-squared = 5.6775, df = 1, p-value = 0.01718 (p<0.05)

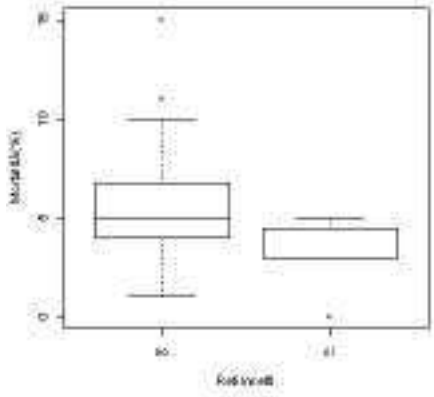


Fig. 3. Boxplot relativo alla presenza delle reti anti insetti.
Fig. 3. *Box-plot presentations of insect screen for windows.*
Kruskal-Wallis chi-squared = 4.0777, df = 1, p-value = 0.04345

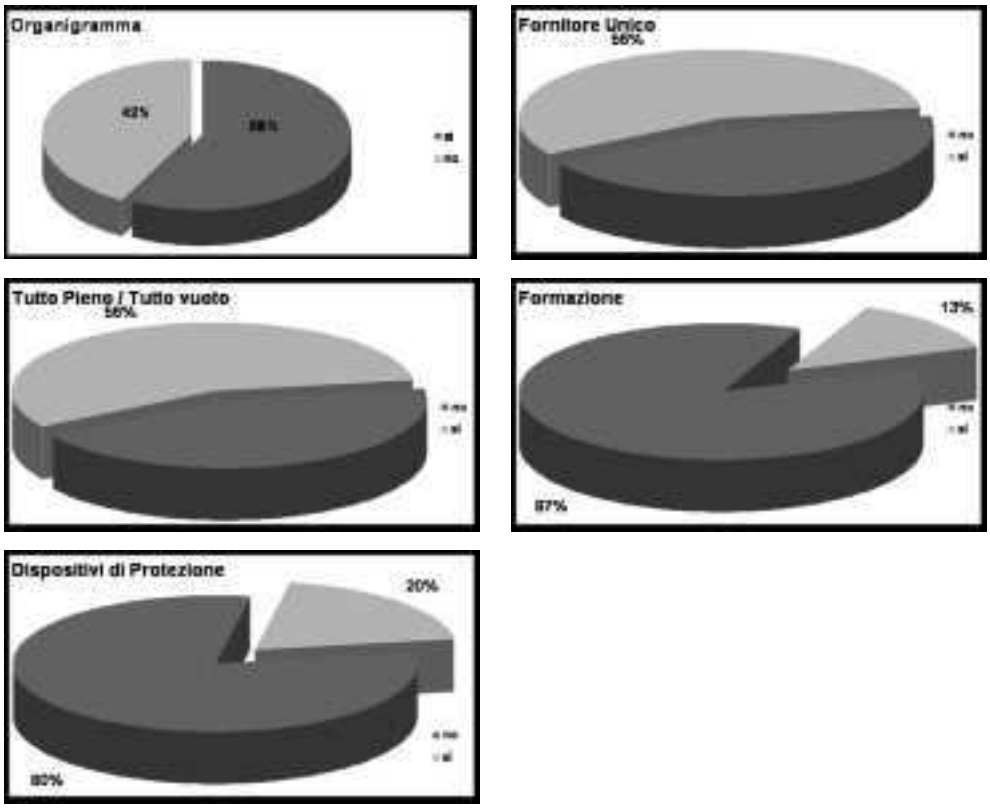


Fig. 4. Presenza e assenza di alcune componenti di biosicurezza.
Fig. 4. *Presence and absence of some components of biosecurity.*

Interessante notare, infine, che se anche non statisticamente significativa, la linea di tendenza che indica una possibile correlazione tra l'aumento di numero di capi per addetto, la presenza di un organigramma.e la percentuale di mortalità e di scarti. Aumentando il numero di aziende oggetto di studio si potrà indagare in maniera più approfondita se questa tendenza viene confermata.
Un'alta percentuale di allevamenti (87%) presenta una bassa formazione del personale, non sono a disposizione materiali di protezione (80%), non è disponibile un materiale ad uso esclusivo (88%), solo 58% presenta un organigramma, il 56% non presenta uno spogliatoio per i visitatori. Non vi è una recinzione continua (68%) e nel 93 % dei casi non ci sono rampe di scarico esterne alla recinzione; nel 67% dei casi non c'è una zona filtro fra la porcilaia e le altre strutture aziendali. Il tutto pieno/tutto vuoto viene attuato solo nel 56% delle aziende e sempre nel 56% dei casi vi è un fornitore unico. Infine nel 85% dei casi non è presente un deposito carcasse per i morti sufficientemente isolato dai locali di stabulazione. Non viene generalmente data importanza a insetti e uccelli quali possibili portatori di malattie (il 86% degli allevamenti non ha dissuasori e l'88% non ha reti alle finestre).

DISCUSSIONE

Il quadro generale dunque non è ottimale. La correlazione statisticamente significativa tra l'utilizzo del materiale ad uso esclusivo e la mortalità sottolinea l'importanza dell'igiene quale prevenzione di eventuali patologie (soprattutto quelle polifattoriali), così come l'isolamento del deposito carcasse.

CONCLUSIONE

Un accurato programma di biosicurezza nell'allevamento suino è sicuramente fondamentale per prevenire l'insorgere di malattie, ma anche per garantire agli allevatori un ambiente lavorativo adeguato nonché un prodotto finale salubre. Dal campione da noi analizzato risulta che sono diversi i punti critici dell'allevamento dei suini all'ingrasso dove il controllo è carente. Un monitoraggio più accurato da parte dei veterinari d'azienda e una campagna di sensibilizzazione sull'importanza di corrette misure di biosicurezza, sarebbe quindi auspicabile.

BIBLIOGRAFIA

Pinto C. Julio and Urcelay V. Santiago (2003). Biosecurity practices on intensive pig production systems in Chile Preventive Veterinary Medicine Volume 59, Issue 3, Pages 139-145

Sona B., Terreni M. (2005) Verifica condizioni di biosicurezza in allevamenti suinicoli. Atti Sipas, Mantova, pag.273-283.

Boklund a., Alban L., Mortensen S., Houe H. (2004) Biosecurity in 116 Danish fattening swineherds: descriptive results and factor analysis. Prev,. Vet. Med. 66 (1-4): 49-62.

Casal J., De Manuel A., Mateu E. and Martín M. (2007) Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. Preventive Veterinary Medicine Volume 82, Issues 1-2: 138-150

R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

IL PROGRAMMA D'AZIONE COMUNITARIO PER LA PROTEZIONE ED IL BENESSERE DEGLI ANIMALI 2006-2010

COMMUNITY ACTION PLAN ON THE PROTECTION AND WELFARE OF ANIMALS 2006-2010

LUIGI GAIDELLA – SIPAS08(*), PAOLO RASORI (*), CARLO CANTONI (**)
(*) ASL di Mantova; (**)Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10 Milano

Parole chiave: benessere del suino, trasporto dei suini, protezione del suino
Keywords: pig transport, pig welfare, pig protection

Riassunto. Gli autori analizzano il recente "Programma d'azione comunitario per la protezione ed il benessere degli animali 2006 - 2010" (PDAC) e la ricaduta sulla filiera suina. Il Programma inizia con una ricognizione sullo stato di attuazione della normativa sul benessere in ambito europeo e attraverso un percorso a tappe vuol perseguire un miglioramento degli standard di benessere animale in allevamento ed una maggior consapevolezza nell'allevatore nel suo ruolo di promotore del benessere. È un documento molto importante che ogni allevatore dovrebbe conoscere poiché ne condizionerà l'attività per i prossimi 10 anni.

Abstract. Authors analyse recent "Community Action Plan on the protection and welfare of animals 2006 - 2010" (PDAC) and pig chain involving. Plan starts from actual situation in EU and describes the road map to improve animal welfare and breeder consciousness as animal welfare promoter. It is an important paper that will condition swine breeding for the next 10 years.

Introduzione

La Commissione Europea ha recentemente elaborato il "Programma d'azione comunitario per la protezione ed il benessere degli animali 2006-2010". Esso è una dichiarazione d'intenti nel campo del benessere delle specie allevate tra cui il suino e che andrà a modificare una situazione normativa in via di consolidamento (a regime entro il 2013 per l'allevamento del suino) o di recentissima applicazione (trasporto del suino). L'allevatore e il professionista che ne offre la consulenza hanno interesse a conoscere l'argomento "benessere", divenuto particolarmente importante per l'allevatore di suini per diversi motivi tra i quali: il rischio di perdere contributi comunitari attraverso il meccanismo della "condizionalità" per chi non rispetta le regole sul benessere in allevamento; l'accresciuta sensibilità dell'opinione pubblica per il benessere degli animali in allevamento e il trasporto; la corresponsabilità di chi affida il trasporto dei propri animali ad un autotrasportatore che viola le norme; infine l'influenza sulla

qualità delle carni macellate a causa di un trasporto eccessivamente stressante per l'animale.
Scopo della presente indagine è quello di analizzare sommariamente la situazione normativa attuale che riguarda il benessere dei suini in allevamento e durante il trasporto e presentare quello che il Programma d'azione comunitario per la protezione ed il benessere degli animali 2006-2010, andrà a introdurre nella filiera del suino ed indirettamente i vantaggi e gli aggravi per l'allevatore di suini.

Materiali e metodi

Attualmente il quadro normativo che riguarda il benessere del suino in allevamento è rappresentato dal D.lgs 146/2001, che tratta del benessere di tutte le principali specie allevate compreso il suino e il D.lgs 53/2004 ultimo di una serie di norme che riguardano i requisiti minimi strutturali, manageriali e sanitari degli allevamenti. Sul trasporto, la normativa è ancora più recente, regolamentata dal regolamento 1/2005 (entrato in vigore il primo gennaio 2007), che ha introdotto alcune salvaguardie per gli animali, come il divieto di trasporto degli animali che non possono spostarsi autonomamente o deambulare senza aiuto.

Risultati

La novità di rilievo per il benessere animale è che esso è inserito in un "Programma d'azione comunitario" (PDAC) ovvero quel complesso di "intenti" che secondo un programma predefinito, si tradurranno in disposizioni legislative e che produrranno interventi a vari livelli dalla formazione degli addetti e della ricerca scientifica sul benessere, alla sperimentazione di nuove tecniche e politiche per incentivare la protezione degli animali: si tratta quindi di un piano strategico integrato che coinvolge più campi d'interesse che hanno nel benessere animale il comune denominatore. Il programma d'azione comunitario non comporta nuovi finanziamenti ma reindirizza quelli di comparto già esistenti.
La sperimentazione di laboratorio con l'utilizzo di animali mantiene un ruolo importante nel PDAC, mentre per quanto riguarda l'allevamento del suino, si possono riassumere i seguenti obiettivi:
1. continuare a promuovere un livello elevato di benessere degli animali nell'UE e in ambito internazionale;
2. coordinare in modo più efficace le risorse esistenti;
3. sostenere la ricerca sul benessere degli animali;
4. adottare una strategia più coerente e coordinata nel settore della protezione e del benessere degli animali in tutte le politiche della Commissione, tenendo conto anche degli aspetti che implichino eventuali costi aggiuntivi per gli operatori degli allevatori.
Le aree tematiche in cui intervenire sono:
1. Aggiornamento degli standard minimi attuali nell'ambito della protezione e del

benessere degli animali tenendo presenti le nuove prove scientifiche e le ultime valutazioni socioeconomiche.
2. Impegno prioritario verso la promozione di una ricerca futura sulla protezione e sul benessere degli animali.
3. Introduzione di indicatori standardizzati del benessere degli animali, al fine di sostenere l'elaborazione di metodi di produzione animale più attenti al benessere degli animali ed agevolarne l'applicazione a livello comunitario ed internazionale anche con la finalità istituire un marchio UE per gli alimenti di origine animale ottenute con standard superiori rispetto ai minimi di legge
4. incremento della consapevolezza del ruolo degli allevatori come promotori della protezione e del benessere degli animali, per contribuire all'informazione dei consumatori nei confronti delle prassi attuali del settore zootecnico e per renderli quindi capaci di effettuare scelte d'acquisto informate. In tale contesto sono state condotte indagini presso i consumatori che hanno confermato la loro disponibilità a pagare maggiormente un prodotto alimentare ottenuto nel rispetto di alti standard del benessere animale.
5. Individuazione, qualora disponibili, d'indicatori specifici per misurare il benessere degli animali nella legislazione comunitaria attuale e futura. Come è noto la mancanza di indicatori oggettivi e riconosciuti che testimoniano ad esempio lo stato di benessere di un suino è l'aspetto più critico di tutta la normativa sul benessere, tanto che si auspica la creazione di un Centro europeo o di un Laboratorio europeo per la protezione ed il benessere degli animali.
6. adozione di un particolare riconoscimento (per esempio marchio sanitario) per gli allevamenti che adottano standard superiori a quelli previsti dalla normativa. Saranno studiate nuove strategie di marketing, etichettatura e comunicazione, affinché i consumatori siano in grado di effettuare scelte d'acquisto più informate**.** Saranno elaborati strumenti specifici per informare meglio i consumatori ed il grande pubblico sulle tecniche moderne di produzione animale e su considerazioni relative al benessere degli animali in particolare elaborare strumenti di formazione online per informare meglio la società e soprattutto i bambini, su tematiche connesse alla protezione e al benessere degli animali.

Discussione

Nello specifico le principali novità che riguarderanno il settore suino sono:
1. revisione della legislazione comunitaria sulla protezione degli animali durante la macellazione o l'abbattimento, incluso l'abbattimento a fini di lotta contro le epizoozie
2. impiego di sistemi di navigazione satellitare nel contesto della protezione degli animali durante il trasporto e creare un sistema di monitoraggio in tempo reale delle condizioni di benessere degli animali durante il trasporto. Attualmente tutti gli automezzi di nuova immatricolazione per il trasporto di animali debbono avere un sistema di navigazione satellitare e quelli già immatricolati se ne dovranno dotare entro il 2009, tutto ciò allo scopo di poter verificare l'andamento del viaggio, i tempi di percorrenza

e di sosta previsti per gli animali. È noto che un viaggio stressante in termini di densità di carico, temperature elevate, impossibilità di abbeveraggio ed alimentazione determina nei suini mortalità, perdita di peso, minor resistenza agli agenti patogeni, deprezzamento della carcassa e della qualità delle carni.
3. stesura di una relazione sulla protezione dei suini in allevamento entro il 2009
4. Creazione di uno strumento legislativo di convalida di sistemi di produzione animale che applichino standard di benessere più elevati di quelli previsti dalla legislazione in vigore
5. Stabilire uno **Standard Qualitativo Europeo** per i prodotti "fabbricati" con sistemi di produzione che rispettano standard più elevati di benessere degli animali e creare uno specifico sistema tecnico e finanziario per promuovere a livello europeo tali standard.

Conclusioni

Il PDAC rappresenta una novità di rilievo per la medicina veterinaria in quanto il benessere diventa argomento importante tale da meritare un "Programma d'azione comunitario" che per la prima volta investirà tutta la filiera dall'allevamento al consumatore.
Per l'allevatore di suini italiano, che ha già applicato nella stragrande maggioranza i requisiti della normativa vigente, probabilmente gli unici vantaggi consisteranno in contributi diretti (finanziamenti condizionati al rispetto delle regole) o indiretti (sostegno ai consumi), solo se riuscirà a produrre suini con standard di benessere più elevati di quanto previsto dalla normativa. Laddove la suinicoltura non ha ancora raggiunto il livello di quella italiana, l'applicazione del PDAC, comporterà oneri per l'allevatore per l'adeguamento, anche se questo sarà molto graduale.

Bibliografia

Community Action Plan on the Protection and Welfare of Animals 2006-2010. Brussels, (23.1.2006) - www.eu.int visitato il 18.12.07

Regione Lombardia: Linee Guida per il benessere degli animali. (Stesura 2005-2) a cura di A. Palma et al. – www.regione.lombardia.it visitato il 22.01.08

REGOLAMENTO (CE) N. 1/2005 DEL CONSIGLIO del 22 dicembre 2004 sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97 Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 3/1 del 5.1.2005

Decreto legislativo 534/1992 Attuazione della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.

Decreto legislativo 53/2004 pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 49 del 28 febbraio 2004 - Supplemento Ordinario n. 30

Decreto Legislativo 146/2001 pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 95 del 24 aprile 2001

PSEUDO-MIASI CAUSATA DA *OPHYRA AENESCENS* (DIPTERA: MUSCIDAE) IN SUINI DA INGRASSO

PSEUDO-MYIASIS CAUSED BY OPHYRA AENESCENS *(DIPTERA: MUSCIDAE) IN SWINES*

MATTIA CALZOLARI[1], GIORGIO LEOTTI[2], MAURO BIANCHI[2], GIUSEPPE SARLI[3], MICHELE DOTTORI[1]
[1]Laboratorio Entomologico IZSLER - Sezione Reggio Emilia; [2]Merial Italia; [3]Università di Bologna - Facoltà di Medicina Veterinaria.

Parole chiave: Pseudo-miasi, *Ophyra aenescens.*
Key words: Pseudo-myiasi, *Ophyra aenescens.*

Riassunto. Nel marzo 2007 abbiamo analizzato feci di suino provenienti da un allevamento di Imola (BO) contenenti larve di dittero, il fenomeno ha fatto sospettare che potesse trattarsi di una inusuale miasi. Il sopralluogo effettuato nell'allevamento ha confermato l'abbondante presenza di larve nell'unica sala nella quale sia era manifestato il problema e la necroscopia su uno dei maiali ha evidenziato la presenza delle stesse larve anche nell'apparato digerente dello stesso. Tutte le larve campionate sono state identificate in laboratorio confermando che si trattava della medesima specie, *Ophyra aenescens.* Il fenomeno osservato è quindi stato spiegato con l'ingestioni delle larve presenti nell'ambiente da parte dei maiali, che le emettevano quindi con le feci senza digerirle, originando una contesto simile a quello causato da una eventuale miasi (pseudo-miasi).

Abstract. In March 2007 we analyzed pig's stool come from a farm in Imola (Bologna) containing Diptera larvae and we suspected that phenomenon could be an unusual myiasi. Our visit in the piggery confirmed the abundant presence of these larvae only in the room where the event was shown and the necroscopy on one of the pigs showed the presence of the same larvae into the digestive system. The laboratory identification of all sampled larvae confirmed that they were all the same species, *Ophyra aenescens*. We explain the observed phenomenon by the pigs' ingestion of larvae in the environment, that were not digested and then discharged by the stool, originating a situatuation similar to a myiasi (called pseudo-miasi).

Introduzione

La mosca *Ophyra aenescens* (Wiendemann, 1830) è originaria del Nuovo Mondo ed è stata introdotta in Europa intorno al 1960, le prime segnalazioni in Italia risalgono al 1964 (Giangaspero, 1997). Questa specie è conosciuta soprattutto come infestante degli allevamenti avicoli (Kettle, 1995) ma è diffusa anche nelle porcilaie (Robertson e Sanders, 1979) ed è molto abbondante nelle discariche (Saccà, 1964). Le larve di *O. aene-*

scens possono adattarsi a diversi regimi alimentari, dagli escrementi di diverse specie animali fino alle carcasse, la presenza di larve su cadaveri può essere utilizzata per stimare l'Intervallo Post Mortem in Entomologia Forense (Levebre e Pasquerault, 2004). Le larve di queste mosche possono anche essere predatici facoltative di larve di altri ditteri, in particolare di *Musca domestica* (Muller, 1982); in ogni caso *O. aenescens* richiede un elevato grado di fermentazione batterica del substrato per il proprio sviluppo larvale.
Le larve di diverse specie della famiglia Muscidae possono generare miasi accidentale nell'uomo e negli animali vertebrati, cioè provocare infestazione alimentandosi dei tessuti morti dell'ospite, dei suoi liquidi corporei o degli alimenti ingeriti, localizzandosi nell'apparato digerente. Esistono alcune segnalazioni di miasi causate dal genere *Ophyra*, ma sono scarse e saltuarie (Zupt, 1965), questi insetti rivestono, piuttosto, una certa importanza sanitaria come vettori meccanici di patogeni quali *E. coli*, salmonelle e shigelle (Giangaspero, 1997).
Scopo del presente lavoro è stato individuare le cause del ritrovamento di larve di dittero in feci di suino, fornendo elementi diagnostici differenziali tra una possibile miasi intestinale e una pseudo-miasi.

Materiali, metodi e risultati

Sopraluogo. Nel Marzo del 2007 è stato possibile esaminare presso il Laboratorio Entomologico dell'IZSLER feci di suino al cui interno erano presenti numerose larve di dittero, il materiale era accompagnato dall'indicazione della presenza di alcune larve ancora vive al momento del campionamento. Questo strano fenomeno è parso spiegabile con due ipotesi plausibili: I) le larve venivano ingerite dall'animale ed emesse senza essere digerite (pseudo-miasi); II) le larve si sviluppavano all'interno del suino da uova che questo poteva ingerire accidentalmente (miasi intestinale).
Per spiegare l'origine di questi episodi è stato fatto un sopraluogo presso l'allevamento il giorno 23 Marzo 2007. Durante il sopraluogo è emerso che il problema si manifestava in una unica sala dell'allevamento. I suini presenti in questa sala erano in ottime condizioni di salute ed erano stati recentemente trattati per risolvere episodi diarroici; inoltre, in prossimità dell'abbeveratoio risultava subito evidente la presenza di larve di dittero, alcune delle quali sono state campionate (fig. 1, tab. 1). Proseguendo l'ispezione abbiamo sollevato le grate di scolo, operazione che ha rilevato la presenza di una massiccia infestazione di larve dello stesso tipo, che sono state campionate (fig. 1, tab. 1). Durante il sopraluogo è stato anche possibile osservare e campionare le stesse larve morte nelle feci appena prodotte da un animale (tab. 1) e catturare alcune mosche adulte presenti nella sala (fig. 3, tab. 1).
Si è quindi proceduto al prelievo di un animale morto da sottoporre a necroscopia, per suffragare una delle due ipotesi. L'analisi necroscopica, effettuata dopo poche ore, ha rivelato che le larve erano presenti in tutto il tratto digerente del maiale: stomaco, piccolo e grosso intestino (fig. 2), anche queste larve sono state campionate (tab. 1).

Identificazione delle larve in laboratorio. Una volta in laboratorio si è proceduto alla

identificazione delle mosche e delle larve campionate (comprese quelle provenienti dalla necroscopia):
Le larve sono state chiarificate immergendole in clorolattofenolo per cinque giorni a temperatura ambiente. Una volta chiarificate sono state sezionate, per evidenziarne i particolari anatomici, quindi montate su vetrino, per l'esame al microscopio ottico. L'identificazione è quindi stata portata a termine utilizzando le appropriate chiavi dicotomiche presenti su manuali (Smith, 1986; Smith 1989; Gorham, 1991) ed articoli scientifici (Ishijima, 1967). I particolari morfologici maggiormente indicativi per l'identificazione della specie sono gli spiracoli (posteriori ed anteriori) e le parti boccali (fig. 3). Gli adulti sono stati identificati con la semplice osservazione allo stereomicroscopio e l'ausilio di chiavi dicotomiche (Oosterbroek, 2006; Smith, 1986; Adams, 1984, Gorham, 1991).
Tutti gli esemplari campionati, sia larve sia adulti, appartenevano alla specie *Ophyra aenescens*, le larve appartenevano tutte al III stadio (tab. 1).

Tabella 1. Luogo di ritrovamento e numero degli esemplari campionati di *Ophyra aenescens.*
Table 1. *Sampling place and specimens number of* Ophyra aenescens.

Luogo di campionameto	numero	stadio
Muro stanza	4	Adulti
Intercapedine grate	82	Larve III
Vicinanze abbeveratoi	12	Larve III
Feci	43	Larve III
Apparato digerente suino (necroscopia)	7	Larve III

Fig. 1. Larve di *Ophyra aenescens* fra le grate di scolo all'interno dell'allevamento.
Fig. 1. *Ophyra aenescens* larvae between grids drain.

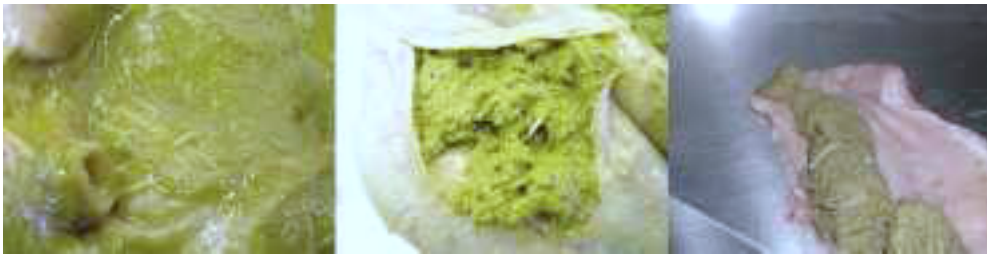


Fig. 2. Larve di *Ophyra aenescens* in diversi tratti dell'apparato digerente di suino.

Fig. 2. *Ophyra a*

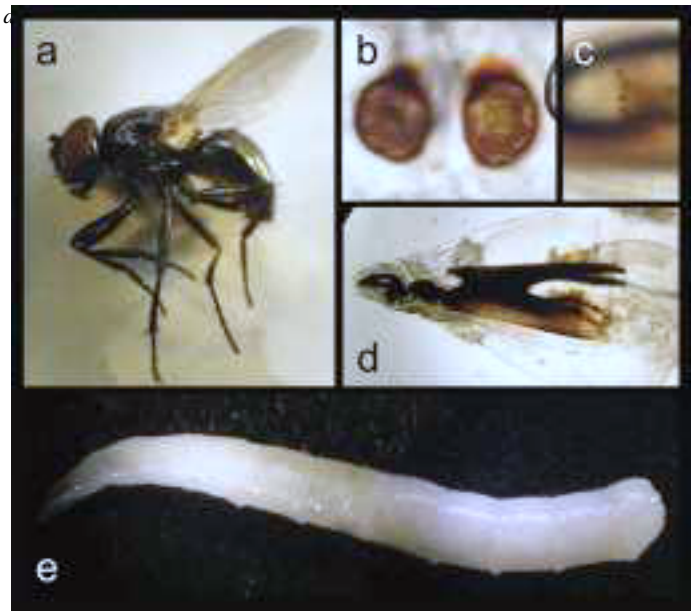


Fig. 3. *Ophyra aenescens*: a) adulto, e) larva di III stadio (stereomicroscopio); b) spiracoli posteriori, c) spiracolo anteriore, d) armatura cefalica (microscopio ottico).
Fig. 3. *Ophyra aenescens*: a) adult, e) third instar larva (stereomicroscope); b) posterior spiracles, c) anterior spiracle, d) mouthparts (optical microscope).

Discussione e conclusioni

Il ciclo di *O. aenescens* è quello tipico dei muscidi: la larva nate dalle uova (I stadio) esegue due mute (attraversando il II e III stadio) prima di divenire pupa, la pupa si trasforma quindi in mosca adulta. Le larve di III stadio abbandonano il substrato in cui sono vissute fino a quel momento per impuparsi ed effettuare la metamorfosi.
O. aenescens depone le uova in gruppi numerosi (circa 70-200 uova) (Giangaspero, 1997), queste si schiudono in 12-16 ore alla temperatura di 28 °C, alla stessa temperatura compie lo stadio preimmaginale (larva-adulto) in 13-14 giorni (Saccà, 1964). La temperatura è uno dei fattori che influenza maggiormente la durata del ciclo di sviluppo, così, in condizioni di laboratorio, se a 17°C l'insetto impiega 825 ore, circa 34 giorni, da uovo ad adulto a 30°C questo tempo è di sole 272 ore, circa 11 giorni (Lefebvre, 2004). La vita media degli adulti, osservata in laboratorio, è di 15 giorni (fino a un massimo di 18) per il maschi e di 20 giorni (fino a un massimo di 35) per le femmine, più longeve (Giangaspero, 1997).
Il sopraluogo nell'allevamento ha evidenziato come le larve di *O. aenescens* avessero trovato un habitat estremamente favorevole nell'intercapedine presente nelle giunzioni fra una grata e l'altra, nella quale si erano accumulate deiezioni in stato semisolido, ottimali per lo sviluppo di questi insetti. Inoltre la temperatura ha favorito la prolifera-

zione delle larve, del resto sono stati descritti altri casi di inusuali ed abbondanti infestazioni di mosche appartenenti a questo genere, legati agli ambienti riscaldati artificialmente (Nelson e Gordon, 1985).
La presenza delle larve di III stadio intere in tutto l'apparato digerente indica che queste sono state ingerite dai maiali e quindi emesse con le feci senza essere digerite. Il comportamento, tipico delle larve dei muscidi, di abbandonare il substrato di sviluppo per impuparsi in un luogo riparato, le ha probabilmente esposte alla ingestione da parte dei suini, che in questo modo hanno anche limitato il numero delle mosche adulte rendendo l'infestazione meno evidente.
Non si esclude inoltre che qualche larva sia stata emessa viva con le feci, in particolare se le larve ingerite erano numerose e le feci dei suini, prima del trattamento antidiarroico, più adatte alla loro sopravvivenza; anche perché lo stesso quadro è stato descritto in casi umani, con l'emissione di larve vive di muscidi nelle feci (Matteson *et all.*, 1985; Laarman e Van Thiel, 1967).
Tutte le evidenze portano quindi ad escludere che si trattasse di una vera miasi intestinale quanto piuttosto di una pseudo-miasi,
Contro l'infestazione si è consigliato di intervenire pulendo in modo approfondito le intercapedini fra le grate ed eliminare il substrato adatto allo sviluppo degli insetti, se possibile anche di adottare degli accorgimenti perché questo strato non si formi nuovamente.
Questi interventi hanno consentito di eliminare il problema evitando trattamenti con prodotti chimici, evitando gli sgraditi effetti collaterali che possono causare. Ricordiamo che i trattamenti abbattenti possono essere usati come coadiuvanti ma non sono risolutivi perché uccidono gli adulti ma non colpiscono le larve, perché i prodotti agiscano sulle larve è necessari assicurarsi che il prodotto le raggiunga dove si trovano, operazione spesso complessa.

Bibliografia

Adams R.G. (1984) "*Ophyra* species as predators in animal houses, with a key to species occurring in Europe (Diptera:. Muscidae)". Entomolo. Gaz., 35, 243-246.

Giangaspero A. (1997) "Le mosche di interesse veterinario. I Muscidae" Bologna, Edagricole.

Gorham J.R. (1991) "Insect and Mite Pests in Food". 2 vol, Washington, USDA ARS.

Ishijima H. (1967) "Revision of the third stage larvae of synanthropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae)". Jpn. J. Sanit. Zool., 18, 47-100.

Kettle D.S. (1995) "Medical and Veterinari Entomology" 2° ed., Cambridge, CAB International, 248-267.

Laarman J.J., Van Thiel P.H. (1967) "A peculiar case of intestinal (pseudo)myiasis and a case of wound myiasis in the Netherlands". Trop. Geogr. Med. 19, 187-191.

Lefebvre F., Pasquerault T. (2004) "Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann, 1818) (Diptera, Muscidae)". Forensic. Sci. Int., 139, 75-79.

Matteson K.L., North D.E., Helgerson S., Catts E.P., Baum L., Kobayashi J. (1985) "Intestinal

Myiasis – Washington" CDC MMWR, 34(10),141-142.
Müller P. (1982) "Significance of the *Musca domestica* antagonist *Ophyra aenescens* (Diptera:Muscidae). III. Laboratory studies of the interaction between the larvae of *M. domestica* and *O. aenescens"* Angew Parasitol.,23(3), 143-154.
Nelson J. M., Gordon P. L. (1985)." An unusual occurrence of *Ophyra capensis* Wiedemann (Diptera: Muscidae)". Entomol. Gaz., 36(3), 227-28.
Oosterbroek P.(2006) "The European Families of the Diptera. Identification, diagnosis, biology" KNNV Publishing.
Robertson S.H., Sanders D.P. (1979) "Species composition and seasonal distribution of the Dipterous fauna inhabiting swine confinement housing in west Texas". Southw. Entomol., 4, 89-95.
Saccà G. (1964) "Nota sulla presenza in Europa di *Ophyra aenescens* WIED. (Dipt., Muscidae)" Riv Parassitol. 25, 295-296.
Smith K.G.V. (1986) "A Manual of Forensic Entomology" Oxford, British Museum of Natural History e Cornell University Press.
Smith K.G.V. (1989) "An introduction to the immature stages of the British flies. Diptera larvae, with notes on eggs, puparia and pupae". Handbk. Ident. Br. Insects 10(14).
Zumpt F. (1965) "Myiasis in man and animals in the old world" London, Butterworths.

IMMUNITÀ INNATA E CELLULO-MEDIATA IN CORSO DI INFEZIONE NATURALE DA VIRUS ETEROLOGO DELLA PRRS: EFFETTO DELLA VACCINAZIONE

INNATE AND CELL-MEDIATED IMMUNITY DURING NATURAL INFECTION BY HETEROLOGOUS PRRSV STRAIN: EFFECT OF VACCINATION

[(1)]PAOLO BORGHETTI, [(1)]LUCA FERRARI, [(1)]VALENTINA FRANCESCHI, [(1)]ELENA DE ANGELIS, [(1)]STEFANO ROSINA, [(1)]EZIO BOTTARELLI, [(2)]STEFANO GOZIO, [(1)]PAOLO MARTELLI

[(1)]Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma - Italy; [(2)]Intervet International – The Netherlands

Parole chiave: PRRSV, ceppo eterologo, vaccinazione, infezione naturale, immunità innata e cellulo-mediata

Key words: PRRSV, heterologous strain, vaccination, natural infection, innate and cell-mediated immunity

Riassunto. Scopo del presente lavoro è lo studio qualitativo e quantitativo della risposta immunitaria innata e cellulo-mediata specifica in corso di infezione naturale da virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS), in particolare sono stati studiati gli effetti dell'immunizzazione in termini di protezione in caso di infezione naturale sostenuta da ceppo eterologo.

Venti animali di 35 giorni d'età, provenienti da un allevamento PRRSV- e *Mycoplasma hyopneumoniae*-free, sono stati suddivisi in due gruppi di 10 animali ciascuno. Un gruppo è stato vaccinato per via intramuscolare (IM) con vaccino Porcilis® PRRS, l'altro gruppo non è stato vaccinato (C). Per un periodo post-vaccinazione (PV) di 45 giorni i venti animali sono rimasti in isolamento e sono stati effettuati prelievi di sangue a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni. Dopo 45 giorni, i venti animali sono stati trasferiti in un allevamento convenzionale con anamnesi patologica recente di malattia respiratoria con coinvolgimento di un isolato di PRRSV eterologo rispetto al ceppo vaccinale.

Tutti gli animali sono stati monitorati clinicamente per un periodo di 34 giorni post-esposizione (PE), sono stati inoltre effettuati prelievi di sangue dopo 0, 4, 7, 11, 14, 19, 21, 27, 34 giorni PE per le indagini immunologiche (caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico, analisi dell'espressione genica in RT-PCR di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatrici quali TNF-α, IFN-γ, IL-10, determinazione del numero di cellule secernenti IFN-γ responsive *ex-vivo* all'antigene PRRSV vaccinale mediante tecnica ELISpot). Gli animali vaccinati e naturalmente esposti al virus eterologo, seppur suscettibili all'infezione, hanno manifestato un certo grado di protezione clinica, significativamente superiore rispetto ai non vaccinati, e sono apparsi più responsivi in termini di immunità innata, come stimolazione dei linfociti T γ/δ e delle cellule NK, ed una più efficiente e rapida espressione di IFN-γ. Inoltre, mentre negli animali vaccinati gli andamenti delle citochine TNF-α, IFN-γ e IL-10

testimoniano di una attivazione precoce di una risposta di fase acuta successivamente modulata al fine di un suo spegnimento controllato, negli animali non vaccinati la produzione di citochine è significativamente inferiore per le prime tre settimane e si incrementa solo più tardivamente con livelli che rimangono elevati nel tempo, giustificando l'andamento più grave delle manifestazioni cliniche. Il mantenimento di elevati livelli di TNF-γ negli animali non vaccinati è indicativo della persistenza di una risposta infiammatoria e di danno infiammatorio che in concomitanza con la persistenza di alti livelli di IL-10 in fase tardiva di infezione, si correlano con la gravità della malattia.

Summary. A qualitative and quantitative study on the innate and cell-mediated immune response was carried out in vaccinated with a MLV and control (unvaccinated) pigs after natural exposure to PRRSV. Twenty-eight-day old pigs (n=20) from a conventional herd, negative for PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* were used. At 5 weeks of age, a group of pigs (n=10) was vaccinated intramuscularly (IM) with Porcilis® PRRS at a dose of $10^{4.5}$ $TCID_{50}$ per pig. Pigs of group C (n=10) were kept unvaccinated and served as controls. In post-vaccination period (PV) the animals were kept in isolation and blood samples were collected at 0, 7, 14, 28 and 45 days. 45 days post-vaccination the animals were moved to conventional finishing herd and mixed with PRRSV-infected resident pigs. Determination of PRRSV specific IFN-γ secreting cells by ELI-Spot, lymphocytes subpopulation by cytometry, cytokines gene expression by RT-PCR were determined on blood samples collected during the post-exposure (PE) period at 0, 4, 7, 11, 14, 19, 21, 27, 34 days. Vaccinated pigs subsequently exposed to a heterologous PRRSV strain, showed a more efficient activation of inflammatory/immune response demonstrated by an increased number of PRRSV-specific IFN-γ secreting cells, stimulation of γ/δ T lymphocytes and NK cells and TNF-α and IFN-γ expression in respect to unvaccinated pigs. Furthermore the trends of pro-inflammatory/pro-immune and anti-inflammatory cytokines (TNF-α, IFN-γ e IL-10) testify a more controlled immune response whereas in unvaccinated and infected pigs the pro-immune cytokines remained low and their increase was delayed. In unvaccinated pigs the maintainance of high levels of TNF-α concomitantly with high levels of IL-10, is consistent with the persistence of inflammation and could parallel with the severity of clinical outcome.

INTRODUZIONE

Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) è responsabile di un'infezione con prolungata viremia e persistenza virale che si protrae per diversi mesi. Il virus interagisce in maniera anomala con il sistema immunitario compromettendo la rapidità e l'efficienza della risposta difensiva innata e, di conseguenza, riducendo gli stimoli infiammatori che sono fondamentali per il reclutamento e l'attivazione delle cellule dell'immunità adattativa, essa si attiva tardivamente ed in maniera incompleta sia per quanto riguarda l'immunità umorale che cellulo-mediata. Diversi autori (Meier et al., 2003; Diaz et al., 2005) hanno osservato che la risposta iniziale a

PRRSV mediata da cellule T è debole o transitoria.. La soppressione dei meccanismi di risposta immunitaria anti-virale innata aumenta inoltre il rischio di infezioni secondarie (Murtaugh et al., 2002, Murtaugh, 2005).
Il virus della PRRS dà luogo a forme cliniche simili anche se i diversi ceppi possiedono caratteri genetici, antigenici e di virulenza differenti; questa eterogeneità rappresenta uno dei maggiori ostacoli per una efficiente prevenzione e controllo della malattia tramite l'uso dei vaccini presenti attualmente in commercio anche se il grado di protezione conferita dai vaccini non dipende dal diversità gnomica. (Prieto et al., 2007).
I vaccini attualmente in commercio sono basati sul cluster *Lelystad-like*; ciò sottolinea l'importanza di studi volti a verificare l'esistenza di protezione e cross-protezione tra virus appartenenti allo stesso cluster e a cluster differenti.
Animali naturalmente infettati con il virus della PRRS sviluppano una forte immunità protettiva in grado di prevenire la re-infezione con un isolato omologo; allo stesso modo immunità protettiva si sviluppa tramite l'utilizzo di vaccini vivi modificati, quando per il *challenge* viene utilizzato lo stesso ceppo vaccinale (Mengeling et al., 1999). Al contrario, animali immunizzati naturalmente non risultano godere di una protezione completa nei confronti di un *challenge* con un virus eterologo; risultati simili sono stati ottenuti con animali immunizzati con un determinato ceppo e infettati sperimentalmente con un ceppo eterologo di PRRSV (Labarque et al., 2003; Martelli et al., 2007).
Scopo del presente lavoro è stato lo studio qualitativo e quantitativo della risposta immunitaria innata e cellulo-mediata specifica in corso di infezione naturale da virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*), al fine di analizzare come la vaccinazione, effettuata con virus vivo attenuato ceppo *DV*, possa avere un importante effetto protettivo nei confronti dell'infezione naturale seppur sostenuta da ceppo eterologo rispetto a quello vaccinale.
In tale valutazione sono stati utilizzati diversi parametri immunitari, quali la responsività linfocitaria (produzione *ex vivo* di IFN-γ antigene PRRSV vaccinale specifica), l'espressione genica delle principali citochine pro-infiammatorie ed immunomodulatrici, le variazioni qualitative e quantitative delle principali sottopopolazioni linfocitarie a fenotipo citotossico nel sangue periferico.

MATERIALI & METODI

Venti animali di 35 giorni d'età, provenienti da un allevamento PRRSV- e *Mycoplasma hyopneumoniae*-free, sono stati suddivisi in due gruppi di 10 animali ciascuno. Un gruppo è stato vaccinato per via intramuscolo con il vaccino Porcilis® PRRS (IM), l'altro gruppo non è stato vaccinato (C). Nel periodo post-vaccinazione (PV), i due gruppi di animali sono stati mantenuti in isolamento per 45 giorni e sono stati effettuati prelievi di sangue a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni. A 45 giorni PV, i venti animali sono stati portati in un allevamento convenzionale con anamnesi patologica di infezione da PRRSV e messi a contatto (esposizione) con gli animali residenti in cui gli accertamenti

diagnostici svolti precedentemente avevano evidenziato un isolato di PRRSV, che alla sequenza dell'ORF5 è risultato presentare un grado di omologia dell'85%.
Per un periodo di 34 giorni post-esposizione (PE) sono stati effettuati prelievi di sangue dopo 0 (giorno 45 PV), 4, 7, 11, 14, 19, 21, 27, 34 giorni per le indagini immunologiche. Secondo protocolli immunitari già applicati in altri lavori (Borghetti et al., 2006a, 2006b; Martelli et al., 2007, Ferrari et al., 2007), come parametri immunitari sono state determinate le principali sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico mediante citofluorimetria a flusso; inoltre è stata effettuata l'analisi dell'espressione genica in RT-PCR di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatrici (TNF-α, IFN-γ, IL-10) e la determinazione del numero di cellule secernenti IFN-γ responsive *ex-vivo* all'antigene PRRSV vaccinale mediante tecnica ELISpot.
L'analisi statistica è stata effettuata mediante test ANOVA, test di Dunnet, test di Tukey-Kramer, test di Fisher e del Chi-quadrato; il grado di significatività è stato definito per valori con $P<0.05$.

RISULTATI

La produzione di IFN-γ PRRSV specifica (Fig.1) è significativamente differente già dopo 2 e 4 settimane PV tra i due gruppi di animali; negli animali vaccinati la produzione di IFN-γ sale in modo significativo fino al giorno dell'esposizione.

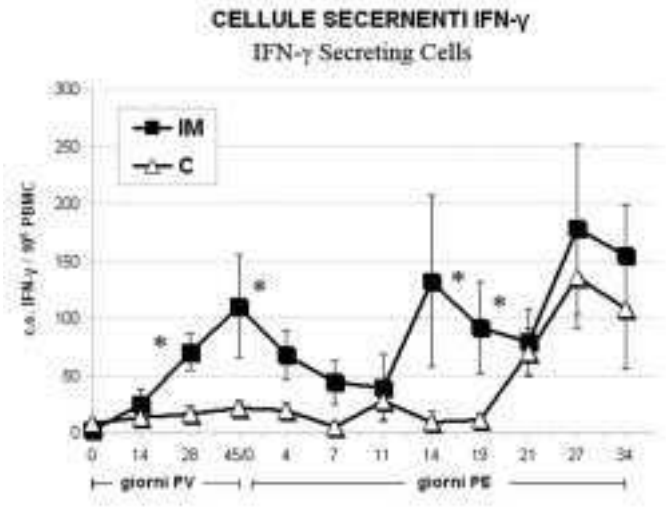


Fig. 1. Livelli di cellule secernenti (c.s.) IFN-γ in risposta a stimolo specifico da PRRSV in vitro negli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ± SE (errore standard); * = $p<0.05$. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 1. *PRRSV-specific IFN-γ Secreting Cells (SC) in vaccinated (IM) and unvaccinated pigs (C). Data shown as mean values ± SE (Standard Error); * = $p<0.05$. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

Dopo il 45° giorno e nel periodo post-esposizione non sono stati registrati ulteriori incrementi ma, anzi, la responsività allo stimolo antigenico PRRS-specifico tende a decrescere pur rimanendo superiore a quella dei non vaccinati fino all'11° giorno PE. Tra l'11° ed il 14° giorno PE il gruppo dei vaccinati mostra una risposta di nuovo in netto incremento con valori significativamente superiori rispetto al gruppo dei non vaccinati dal 14° al 19° giorno PE. Negli animali non vaccinati la risposta rimane pressoché nulla fino al 21° giorno PE quando raggiunge valori sovrapponibili a quella dei vaccinati.

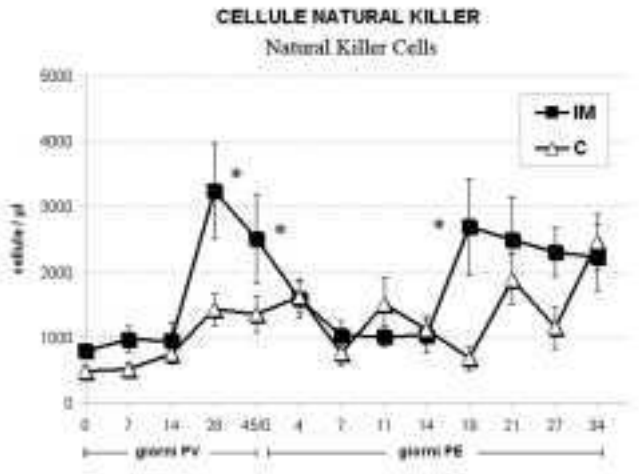


Fig. 2. Cambiamenti temporali delle cellule CD3-CD8a+ (cellule NK) negli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ± SE (errore standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 2. *Time-related changes of CD3-CD8a+ cells (Natural Killer cells) in vaccinated (IM) and unvaccinated pigs (C). Data shown as mean values ± SE (Standard Error); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

Analizzando l'andamento delle cellule NK (Fig.2), si può notare come a 28 e 45 giorni PV il loro numero sia significativamente maggiore nei vaccinati rispetto ai non vaccinati. Il numero delle cellule NK aumenta negli animali vaccinati dal 14° giorno PE e si mantiene elevato sino al 34° PE, mentre nei non vaccinati aumenta in modo irregolare solo dal 21° giorno PE.
Nel periodo di esposizione, il numero di CTL nei vaccinati incrementa significativamente dopo il 14° giorno PE con picco al 19° giorno PE. Il numero di CTL si mantiene significativamente più elevato nei vaccinati fino a 27 giorni PE. Negli animali non vaccinati il numero dei CTL si mantiene pressoché costante per tutto il periodo di esposizione all'infezione.

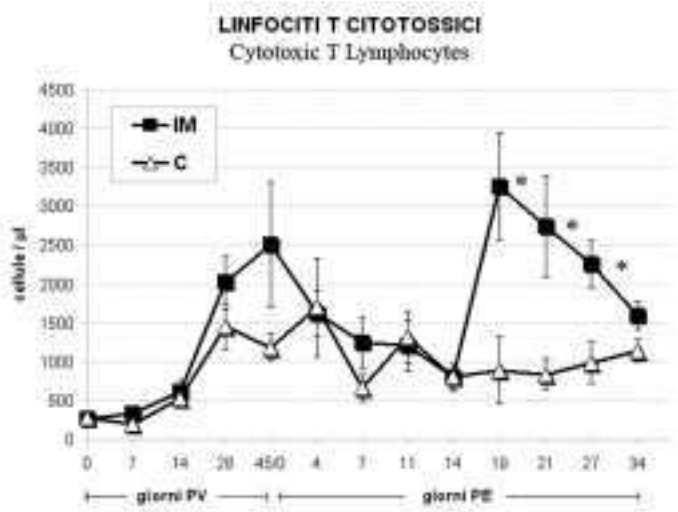


Fig. 3. Cambiamenti temporali delle cellule CD4-CD8α+^{high} (Linfociti T Citotossici) negli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ± SE (errore standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 3. *Time-related changes of CD4-CD8α+^{high} cells (Cytotoxic T Lymphocytes) in vaccinated (IM) and unvaccinated pigs (C). Data shown as mean values ± SE (Standard Error); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

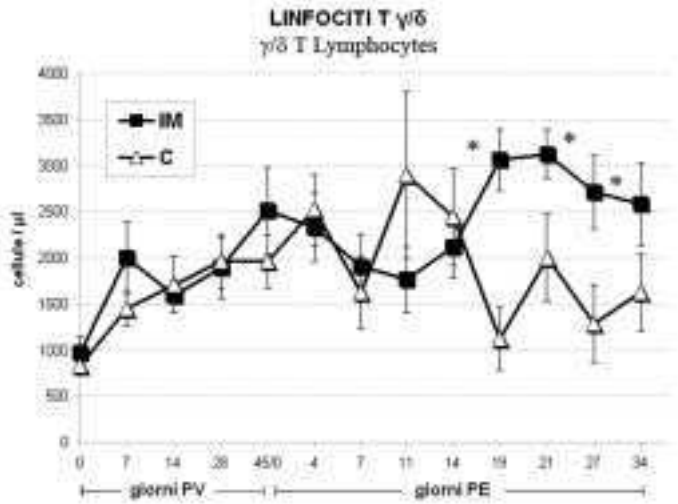


Fig. 4. Cambiamenti temporali delle cellule TCRγδ+ (Linfociti T γδ) negli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ± SE (errore standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 4. *Time-related changes of TCRγδ+ cells (γδ T Lymphocytes) in vaccinated (IM) and unvaccinated pigs (C). Data shown as mean values ± SE (Standard Error); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

Dal 14° giorno PE nei vaccinati i valori di linfociti T gd salgono verso valori significativamente più elevati e si mantengono tali fino a 34 giorni PE; i non vaccinati mostrano un valore transitoriamente più elevato a 11 giorni PE per poi mantenere valori costantemente inferiori agli animali vaccinati.
I livelli di espressione di TNF-α (Fig. 5) risultano sovrapponibili nei due gruppi fino al 7° giorno PE mentre a 14 giorni PE si ha un aumento significativo nell'espressione del TNF-α nei vaccinati rispetto ai controlli. I livelli di espressione diminuiscono poi velocemente a partire dal giorno 21 PE fino al giorno 34 PE. Negli animali non vaccinati il livello di espressione non mostra variazioni fino al 14° giorno PE, per poi incrementare e mantenersi a livelli nettamente più elevati rispetto al gruppo degli animali vaccinati.

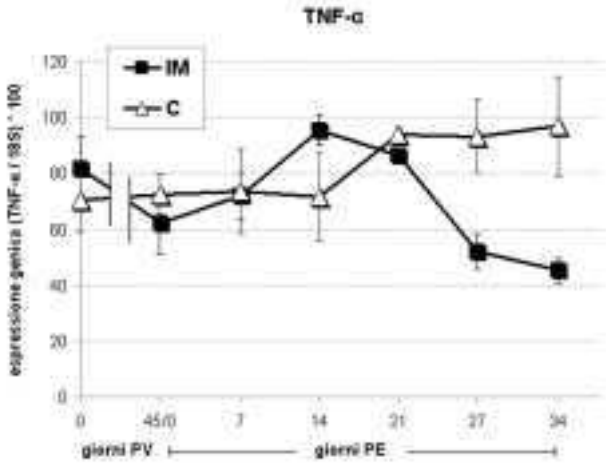


Fig. 5. Espressione genica di TNF-α in PBMC degli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C); Dati riportati come valori medi ± SE (deviazione standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione. ***Fig. 5.*** *TNF-α gene expression in PBMC of vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ± SE (Standard Deviation); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

Per quanto riguarda l'espressione genica di IFN-g nei leucociti del sangue (Fig. 6) gli animali vaccinati, già nella prima settimana PE, mostrano valori maggiori che persistono significativamente più elevati fino a 21 giorni PE rispetto agli animali non vaccinati. A partire dal 21° giorno i valori di espressione calano nei vaccinati mentre salgono tardivamente, pur con minore entità, nei non vaccinati, mantenendosi significativamente differenti fino al termine del periodo di osservazione.
L'espressione genica di IL-10 (Fig.7) fin dall'inizio del periodo di esposizione in entrambi i gruppi aumenta lentamente fino al 14° giorno; successivamente diminuisce negli animali vaccinati mentre negli animali non vaccinati si mantiene a livelli più elevati fino alla fine del periodo di osservazione.

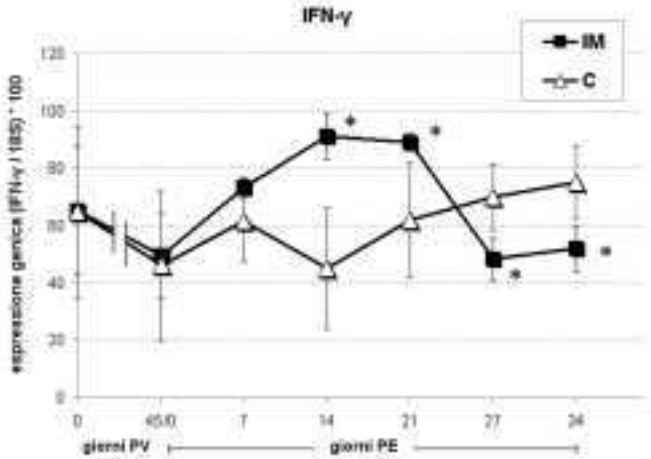


Fig. 6. Espressione genica di IFN-γ in PBMC degli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Valori medi ± SE (deviazione standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 6. *IFN-γ gene expression in PBMC of vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ±SE (Standard Deviation); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

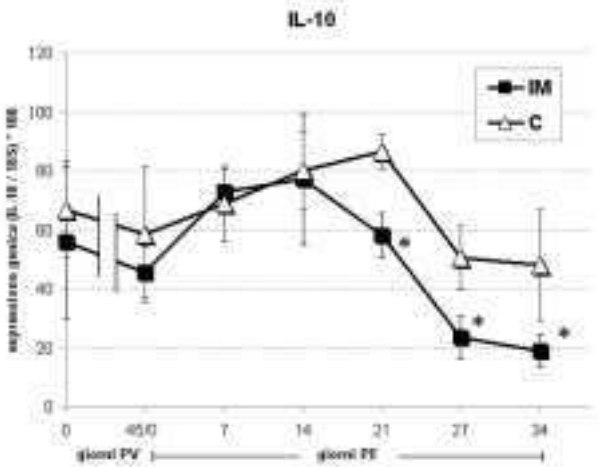


Fig. 7. Espressione genica di IL-10 in PBMC degli animali vaccinati (IM) e non vaccinati (C). Valori medi ± SE (deviazione standard); * = p<0.05. PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione.
Fig. 7. *IL-10 gene expression in PBMC of vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ±SE (Standard Deviation); * = p<0.05. PV: post-vaccination, PE: post-exposure.*

DISCUSSIONE

Sia nel periodo post vaccinazione che dopo esposizione all'infezione naturale negli animali vaccinati si è avuto un incremento significativo del numero di cellule secer-

nenti (SC) IFN-γ e ciò appare coerente con l'incremento significativo, agli stessi tempi, delle cellule NK (CD3-CD8+^{low}), dei linfociti CTL (CD4-CD8+^{high}) e dei linfociti g/d, che rappresentano le principali sottopopolazioni in grado di produrre tale citochina.
Dati in letteratura riportano un aumento significativo del numero di IFN-g SC 14 giorni dopo infezione da PRRSV (Meier et al., 2003); il maggior numero di SC è stato da noi riscontrato a 28 giorni PE, in accordo con altri studi (Cano et al., 2007). Questo incremento temporale di responsività dei PBMC durante l'infezione da virus eterologo, porta a considerare che possano essere le cellule NK o, più probabilmente, i linfociti T γ/δ ad essere in grado di attivarsi per effetto del virus eterologo (Olin et al., 2004) piuttosto che le cellule antigene specifiche come i CTL.
Sia l'andamento delle cellule secernenti IFN-γ che l'espressione di citochine proinfiammatorie e proimmunitarie evidenziano come nell'animale infettato si instauri una risposta immunitaria inefficiente e lenta a svilupparsi, caratterizzata dalla produzione inadeguata di IFN-γ da parte delle cellule linfocitarie conseguenza di una debole risposta innata al virus. Ciò appare evidente negli animali non vaccinati dove l'espressione di IFN-γ si incrementa in maniera limitata e molto graduale, solo dopo il 14°-21° giorno di infezione.
Infatti, in analogia con quanto riportato da altri Autori, l'infezione naturale da PRRSV risulta indurre una bassa o addirittura assente produzione di citochine innate, nello specifico TNF-α, che condiziona una debole e tardiva risposta adattativa in termini di produzione di IFN-γ (Royaee et al., 2004, Meier et al., 2003).
Negli animali vaccinati l'espressione di TNF-α aumenta invece più precocemente, raggiungendo livelli significativamente più elevati al 14° giorno PE in associazione con un più precoce e sostenuto incremento di IFN-γ.
L'infezione negli animali non vaccinati pertanto ha come conseguenza la compromissione dell'efficienza del sistema immunitario con soppressione delle citochine proinfiammatorie ed un ritardo nell'attivazione della risposta stessa. È noto infatti come il virus della PRRS induca una bassa o addirittura assente produzione di citochine innate (TNF-α e IFN-α) (Van Reet et al., 1999; Miller et al., 2004) che determina una debole risposta adattativa in termini di produzione di IFN-γ. Diversamente, il mantenimento nel tempo di elevati livelli di TNF-α negli animali non vaccinati è indicativo della persistenza di una risposta infiammatoria. Ciò non è indicativo di una tardiva attivazione innata o Th1-mediata quanto del fatto che i persistenti livelli di TNF-α sono predittivi di uno stato infiammatorio protratto e di danno tessutale scarsamente controllato (Martin et al., 1997). Di conseguenza, l'andamento di tale citochina è facilmente correlabile con la maggiore gravità clinica registrata negli animali non vaccinati (Martelli et al., 2007).
L'unica citochina che mostra incrementi significativi nei controlli rispetto ai vaccinati è l'IL-10, in concordanza con numerosi dati in letteratura (Royaee et al., 2004). In entrambi i gruppi l'IL-10 si incrementa nel periodo di infezione naturale e si mantiene ad elevati livelli fino al 21° giorno PE. Successivamente, persiste significativamente più elevata nei controlli rispetto agli animali vaccinati fino alla fine del periodo di osservazione.

IL-10 è una citochina ad azione anti-infiammatoria con la funzione di controllare e di "spegnere" il fenomeno flogistico. Nel caso dell'infezione da PRRSV, la sua espressione può essere stimolata dal virus e, in questo caso, riduce e ritarda la risposta innata e cellulo mediata Th1, mentre la persistenza dei suoi livelli in fase tardiva può contribuire in maniera importante alla gravità della malattia, grazie allo squilibrio in rapporto ai livelli elevati di TNF-α. Recentemente, è stato infatti dimostrato che la durata e l'intensità della risposta anti-infiammatoria (IL-10, IL-1Ra) sia altrettanto importante nel condizionare la mortalità per effetto di una immunosoppressione protratta che, inevitabilmente, aumenta il rischio di sovrainfezione (Ashare et al., 2005).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano che durante l'infezione naturale, seppur sostenuta da ceppo eterologo e la forma clinica che ne consegue, la vaccinazione rende più responsivi gli animali in termini di immunità innata, attraverso una maggiore stimolazione dei linfociti T γ/δ e delle cellule NK. Negli animali vaccinati si osserva infatti una più rapida attivazione della risposta immunitaria innata che consente di rispondere in modo più efficiente all'infezione di campo come evidenziato dalla produzione di IFN-γ, che nei suini non vaccinati è nettamente più tardiva. Inoltre, negli animali vaccinati, gli andamenti delle citochine TNF-α, IFN-γ e IL-10 testimoniano di una attivazione precoce di una risposta di fase acuta successivamente modulata con spegnimento controllato del processo infiammatorio. Al contrario, negli animali non vaccinati, tali citochine si attivano in maniera limitata e più tardivamente mantenendosi a livelli elevati nel tempo. In particolare, il mantenimento di elevati livelli di TNF-α negli animali non vaccinati, in concomitanza di alti e persistenti livelli di IL-10, sono indicativi di una risposta infiammatoria protratta con conseguente danno tessutale che sottende ad una maggiore gravità clinica.
Le differenze osservate in questo lavoro tra animali vaccinati e non vaccinati, solo parzialmente riscontrate durante una infezione sperimentale (Martelli et al., 2007) in condizioni di laboratorio, dimostrano come in corso di infezione naturale l'effetto protettivo della vaccinazione nei confronti di un virus eterologo sia decisamente più manifesto e ben caratterizzato in termini di efficienza della risposta immunologica che si correla ampiamente con la protezione clinica.

BIBLIOGRAFIA

Murtaugh M.P., Xiao Z. e Zuckermann F. (2002). "Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection". Viral Immunology, 15, 533-547.

Murtaugh M.P. (2005). PRRSV/Host interaction**.** Proceedings of Symposium "PRRS: Facts and Speculation", 29-46.

Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E. (2005). "Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Journal of General Virology, 86, 1943-51.

Xiao Z., Batista L., Dee S., Halbur P., Murtaugh M.P. (2004). "The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load". Journal of Virology, 78, 5923-5933.

Prieto C., Alvarez E., Martinez-Lobo F.J., Simarro I., Castro J.M. (2007) "Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred". Vet J. *Article in Press*.

Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C. (1999) "Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome". Am J Vet Res 60, 796-801.

Martelli P, Cordioli P, Alborali LG, Gozio S, De Angelis E, Ferrari L, Lombardi G, Borghetti P. (2007) "Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain". Vaccine 25, 3400-3408.

Borghetti P., De Angelis E., Saleri R., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Mocchegiani E., Martelli P. (2006a) "Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: Relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes". Vet Immunol Immunopathol 110, 17-25.

Borghetti P. Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Saleri R., Corradi A. Martelli P. (2006b) "Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets". Vet Res Commun, 30 (suppl) 227-230.

Ferrari L., Borghetti P., De Angelis E., Corradi A., Bonilauri P., Gozio S., Martelli P. "Risposta immunitaria innata dopo infezione naturale da PRRSV". XXXIII Congresso Nazionale SIPAS, Modena, 29-30 marzo 2007.

Royaee A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Scnitzlein W.M., Zuckermann F., Lunney J.K. (2004) "Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination". Vet Immunol Immunopathol. 102, 199-216.

Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E. (2005) "Immune response of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus". J General Virol. 86, 1943-1951.

Cano J.P., Dee S.A., Murtaugh M.P., Trincado C.A., Pijoan C.B. (2007) "Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs". Am J Vet Res 68, 565-571.

Olin M.R., Batista L., Xiao Z., Dee S.A., Murtaugh M.P., Pijoan C.C., Molitor T.W. (2005) "Gamma-delta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Viral Immunology, 18, 490-499.

Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Scnitzlein W.M., Zuckermann F.A. "Gradual development of the interferon-g response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination". Virology, 309, 18-31 (2003).

Martelli P., Rosina S., Bottarelli E., Gozio S., Ferrari L., De Angelis E., Borghetti P. (2007) "Efficacy of Eu-PRRS attenuated vaccine to control respiratory disease in pigs naturally exposed to a virulent heterologous field virus". 5th Intern Symp on Emerging and Re-emerging Pig Diseases - Krakow, Poland, 204.

Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M. (1999) "Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity". Res Vet Sci, 67, 47-52.

Miller L.C., Laegreid W.W., Bono J.L., Chitko-McKown C.G., Fox J.M. (2004) "Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells". Arch Virol. 149, 2453-2463.

Martin C., Bolsson C., Haccoun M., Thomachot L., Mege J.L. (1997) "Pattern of cytokine evolution (tumor necrosis factor-a and interleukin-6) after septic shock, haemorragic shock and severe trauma". Crit Care Med, , 25, 1813-1819.

Ashare A., Powers L., Butler N.S., Doerschug K.C., Monick M.M., Hunninghake G.W. (2005) "Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis". Am J Phisiol Lung Cell Mol Physiol, 288, 633-640.

RISPOSTA NEUROENDOCRINA ED EVOLUZIONE CLINICA IN CORSO DI INFEZIONE DA PRRSV: EFFETTO PROTETTIVO DELLA VACCINAZIONE

NEUROENDOCRINE RESPONSE AND CLINICAL OUTCOME TO PRRSV INFECTION: PROTECTIVE EFFECT OF VACCINATION

[(1)]PAOLO BORGHETTI, [(2)]ROBERTA SALERI, [(1)]VALENTINA FRANCESCHI, [(1)]LUCA FERRARI, [(2)]VALERIA CAVALLI, [(1)]ELENA DE ANGELIS, [(1)]STEFANO ROSINA, [(1)]EZIO BOTTARELLI, [(3)]STEFANO GOZIO [(1)]PAOLO MARTELLI

[(1)] Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma, Italia; [(2)] Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma, Italia; [(3)] Intervet International – The Netherlands

Parole chiave: PRRSV, sintomatologia, vaccinazione, infezione naturale, risposta neuroendocrina.
Key words: PRRSV, clinical outcome, vaccination, natural infection, neuroendocrine response.

Riassunto. Scopo del lavoro è stata la valutazione della relazione tra gli andamenti temporali di alcuni ormoni e citochine ad attività neuroimmunitaria in corso d'infezione naturale da virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino in soggetti vaccinati e non vaccinati (controlli) al fine di comprendere il ruolo della vaccinazione in termini di protezione non solo su base prettamente immunologica ma anche clinica.
Venti animali di 35 giorni d'età, provenienti da un allevamento PRRSV- e *Mycoplasma hyopneumoniae*-free, sono stati suddivisi in due gruppi di 10 animali ciascuno, uno dei quali è stato vaccinato per via intramuscolare (IM) con MLV ceppo europeo (Porcilis® PRRS) mentre l'altro gruppo non è stato vaccinato (C). Per un periodo post-vaccinazione (PV) di 45 giorni i venti animali sono rimasti in isolamento e sono stati effettuati prelievi di sangue a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni. Al 45° giorno, detti animali sono stati trasferiti dal sito di isolamento ad un allevamento convenzionale con anamnesi patologica prossima di malattia respiratoria sostenuta da PRRSV eterologo rispetto al ceppo vaccinale. Pertanto, gli animali sono stati naturalmente esposti a PRRSV per contatto diretto con soggetti infetti. Tutti gli animali sono stati monitorati giornalmente per i segni clinici per un periodo di 34 giorni post-esposizione (PE). Inoltre, sono stati effettuati prelievi di sangue a 0 (giorno 45 PV), 4, 7, 11, 14, 19, 21, 27, 34 giorni post-esposizione per l'esecuzione di determinazioni ormonali e analisi dell'espressione genica in RT-PCR di citochine neuro-immunomodulatrici (IL-6).
Dopo esposizione naturale, il 100% degli animali considerati sono risultati infetti. Nel gruppo di animali vaccinati le manifestazioni cliniche sono risultate di gravità e durata

significativamente inferiori (68%) rispetto a quanto registrato nel gruppo non vaccinato.
Gli animali non vaccinati, durante l'infezione, non attivano l'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene, con inibizione della produzione di cortisolo plasmatico, mentre gli animali vaccinati mostrano livelli più elevati ad indicare un maggiore controllo sull'infiammazione e, conseguentemente, sostenere l'evidenza clinica di una minore gravità della malattia. Il ridotto incremento di IL-6 e di GH nella prime settimane di infezione negli animali non vaccinati indica una scarsa attivazione della risposta innata. Inoltre, il mantenimento di elevati livelli di IL-6 in fase tardiva (dopo 21 giorni di esposizione) è indicativo di cronicizzazione dell'infiammazione e, in concomitanza con elevati livelli di TNF-? e di IL-10, si collega ad un maggior danno tessutale. Questo studio evidenzia che la relazione funzionale tra ormoni e citochine infiammatorie può essere rappresentativa del decorso clinico e spiegare la ridotta gravità della malattia negli animali vaccinati rispetto a quelli non vaccinati.

Summary. The study was designed to analyze the relationship between some hormones and neuro-immune cytokines during PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) in vaccinated and unvaccinated pigs, in order to understand the role of vaccination in the immunological and clinical protection. Thirty five day old pigs (n=20) negative to PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* were divided in two groups, group IM (n=10) vaccinated intramuscularly (IM) with Porcilis® PRRS and group C (n=10) kept unvaccinated (controls). In the post-vaccination period (PV) the animals were kept in isolation and blood samples were collected at 0, 7, 14, 28 and 45 days. 45 days post-vaccination (PV), the animals were moved to a conventional finishing herd and mixed with PRRSV-infected resident pigs. All animals were daily monitored for clinical signs and plasmatic GH, cortisol and IL-6 were determined at 0 (45 days PV), 7, 14, 21, 27, 34 days post-exposure (PE).
After natural exposure all animals were infected. In vaccinated animals clinical signs were reduced (68%) either in term of severity and duration compared to controls.
In unvaccinated pigs, the infection down regulates the cortisol and GH response; furthermore, inflammatory cytokine (IL-6) expression remained low and their increase was delayed concomitantly with low levels of cortisol. A down regulation of cortisol, the maintainance of high levels of TNF-α (shown in other paper) and of IL-6 are consistent with the chronicization of inflammation and unopposed inflammatory damage. This study shows that the functional relathionship between hormones and inflammatory cytokines could represent important markers which parallel the clinical outcome supporting the partial clinical protection in vaccinated pigs.

INTRODUZIONE

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di un complesso sistema di *"cross talking"* tra il sistema immunitario e quello neuro-endocrino; questo circuito di comunicazione risulta fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi metabolica

e comportamentale dell'organismo animale e principalmente dipende dalle interconnessioni funzionali tra ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS), dell'asse somatotropo (GH/ IGF1), neuropeptidi e neurotrasmettitori con le citochine infiammatorie ed immunitarie. Diversi fattori neuroendocrini influenzano lo sviluppo del sistema immunitario (1,2) e sono in grado di modulare la risposta immunitaria durante un'infezione, mentre a loro volta le citochine prodotte durante la risposta infiammatoria e immunitaria agiscono sul Sistema Nervoso attivando una risposta neuroendocrina che controlla l'infiammazione e regola il ritorno all'omoestasi dopo la clearance del patogeno. Durante un'infezione, la risposta immunitaria naturale e adattativa al patogeno è modulata da una integrata risposta neuroimmunitaria che potenzia l'immunità innata, controlla potenziali effetti dannosi dell'infiammazione, ed indirizza i cambiamenti metabolici e nutrizionali a supporto del sistema immunitario (3, 4). Negli ultimi anni, notevoli conoscenze sono state ottenute sui segnali molecolari che orchestrano questa risposta adattativa integrata influenzando l'efficienza ed il controllo della risposta protettiva e le cui alterazioni possono rappresentare meccanismi coinvolti nella cronicizzazione dell'infiammazione e nel danno tessutale infiammatorio con conseguente influenza negativa sull'esito clinico della malattia (5, 6) e sulle performance produttive.

In contrasto all'uomo ed agli animali di laboratorio, negli animali da reddito non sono stati effettuati molti studi sull'effetto dell'attivazione immunitaria sulla risposta neuroendocrina; inoltre molti di questi studi sono stati effettuati utilizzando l'endotossina (LPS) come induttore immunitario mentre sono limitati i dati relativi ad una infezione naturale.

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della relazione tra gli andamenti temporali di alcuni ormoni e citochine ad attività neuroimmunitaria durante infezione naturale da virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino in soggetti vaccinati e non quando esposti naturalmente all'infezione in condizioni di campo. Tale indagine è stata condotta non solo perché non ci sono dati relativi di come l'infezione possa modulare la risposta neuro-endocrina ma anche nella prospettiva di capire se tali modificazioni possano essere la chiave di lettura per spiegare come durante l'infezione da virus eterologo, la vaccinazione comunque sia in grado di conferire protezione non solo su una base prettamente immunologica ma anche clinica.

MATERIALI & METODI

Venti animali di 35 giorni d'età, provenienti da un allevamento PRRSV- e *Mycoplasma hyopneumoniae*-free, sono stati suddivisi in due gruppi di 10 animali ciascuno, uno dei quali è stato vaccinato per via intramuscolare (IM) con MLV ceppo europeo (Porcilis® PRRS) mentre l'altro gruppo non è stato vaccinato (C). Per un periodo post-vaccinazione (PV) di 45 giorni, i venti animali sono rimasti in isolamento e sono stati effettuati prelievi di sangue a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni. Al 45° giorno, i venti animali sono stati trasferiti in un allevamento convenzionale con anamnesi patologica prossima di malattia respiratoria sostenuta da PRRSV eterologo rispetto al ceppo vaccinale. Pertanto gli

animali sono stati naturalmente esposti a PRRSV per contatto diretto con soggetti infetti.
Tutti gli animali sono stati monitorati giornalmente per i segni clinici per un periodo di 34 giorni post-esposizione (PE) secondo uno schema descritto da Martelli et al. (7). Inoltre sono stati effettuati prelievi di sangue al giorno 0 (giorno 45 PV), 4, 7, 14, 21, 27 e 34 giorni per l'esecuzione di determinazioni ormonali e analisi dell'espressione genica in RT-PCR di citochine neuro-immunomodulatrici (IL-6) con metodiche descritte in precedenti lavori (1, 2, 8).
L'analisi statistica è stata effettuata mediante test ANOVA, test di Dunnet, test di Tukey-Kramer, test di Fisher e del Chi-quadrato; il grado di significatività è stato definito per valori con $P<0.05$.

RISULTATI

Dopo esposizione naturale a PRRSV il 100% degli animali considerati sono risultati infetti (Fig.1).

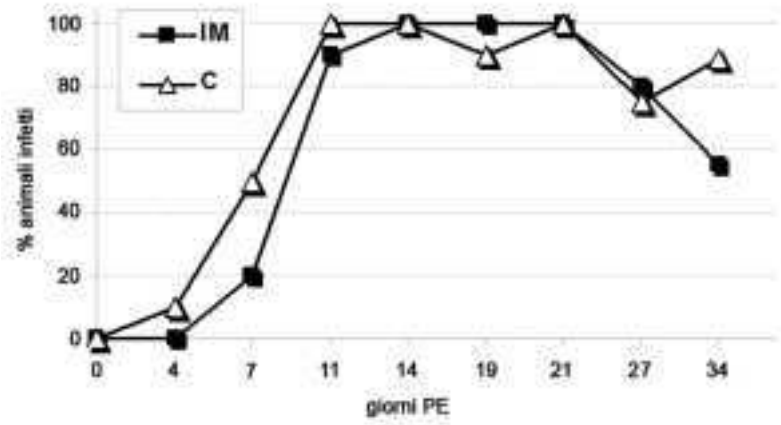


Fig. 1. Percentuale di soggetti infetti nel gruppo di suini vaccinati contro la PRRS (IM) e non vaccinati (C) nel periodo post-esposizione (PE).
Fig. 1. *Percentage of infection in PRRS vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs after natural exposure (PE).*

Nel gruppo di animali vaccinati le manifestazioni cliniche sono risultate di gravità e durata significativamente inferiori (68%) rispetto a quanto registrato nel gruppo non vaccinato.
L'evoluzione clinica nel tempo dello score clinico complessivo (segni di malattia respiratoria + segni di interessamento sistemico) sono riportati in figura 2.

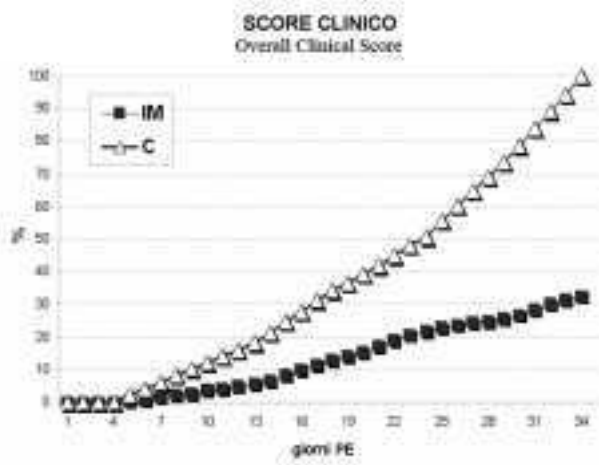


Fig. 2. Score clinico cumulativo (segni di malattia respiratoria + segni di interessamento sistemico) in suini vaccinati contro la PRRS (IM) e non vaccinati (C) nel periodo post-esposizione (PE).
Fig. 2. *Overall clinical score (respiratory disease score + general clinical score) in PRRS vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs after natural exposure (PE).*

Negli animali vaccinati il livello plasmatico del cortisolo aumenta in maniera significativa tra il 7° ed il 14° giorno PV per poi tornare sovrapponibile ai valori registrati nei controlli fino al momento dell'esposizione. Negli animali vaccinati nella prime due settimane di esposizione il cortisolo si mantiene a valori basali significativamente superiori a quello degli animali non vaccinati; in questi ultimi, invece, è stata dimostrata una caduta dei valori di cortisolo fin dall'inizio dell'esposizione (Fig.3).

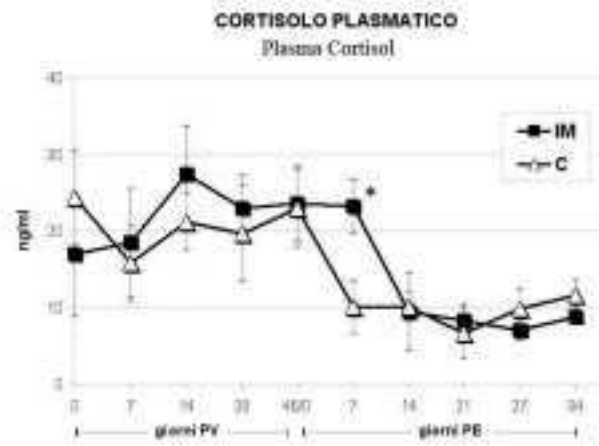


Fig. 3. Livelli plasmatici di *cortisolo* in suini vaccinati contro la PRRS (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ±SD (Deviazione Standard). PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione, * = p<0.05.
Fig. 3. *Cortisol plasma levels in PRRS vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ±SD (Standard Deviation). PV: post-vaccination, PE: post-exposure, * = p<0.05.*

Vi è una significativa differenza nell'andamento dei livelli plasmatici di GH tra i due gruppi (Fig.4). A partire dal 7° giorno PV, i valori di GH negli animali vaccinati sono nettamente più elevati rispetto a quelli dei non vaccinati, con differenze significative per l'intero periodo post-vaccinazione. Negli animali vaccinati si ha un picco plasmatico di GH al 7° giorno PV, poi i valori scendono lentamente per poi salire e raggiungere un nuovo picco, di valore assoluto maggiore, al 7° giorno PE. Nei controlli non si hanno variazioni significative nella concentrazione plasmatica di GH in tutto il periodo PV, con solo un lieve incremento nelle prime due settimane PE.

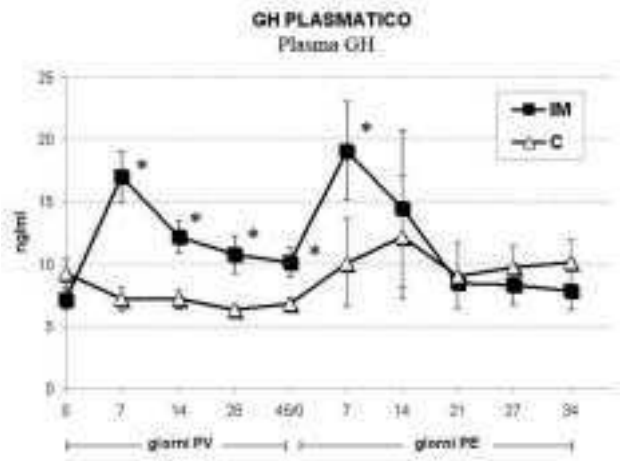


Fig. 4. Livelli plasmatici di *GH* in suini vaccinati contro la PRRS (IM) e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ±SD (Deviazione Standard). PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione, * = p<0.05.
Fig. 4. *GH plasma levels in PRRS vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ±SD (Standard Deviation). PV: post-vaccination, PE: post-exposure, * = p<0.05.*

A partire dal giorno dell'esposizione i livelli di espressione dell'IL-6 (Fig.5) aumentano sia nei vaccinati che nei non vaccinati, ma nella seconda e terza settimana PE negli animali vaccinati si osservano livelli più elevati con valore significativamente maggiore al 14° giorno PE. Al contrario, i livelli di espressione di IL-6 negli animali non vaccinati hanno un significativo incremento a partire dal giorno 21 PE, e tali si mantengono fino al giorno 34 PE; nei vaccinati si assiste invece ad una diminuzione del livello di espressione di IL- 6 dal 21° giorno fino al termine del periodo PE.

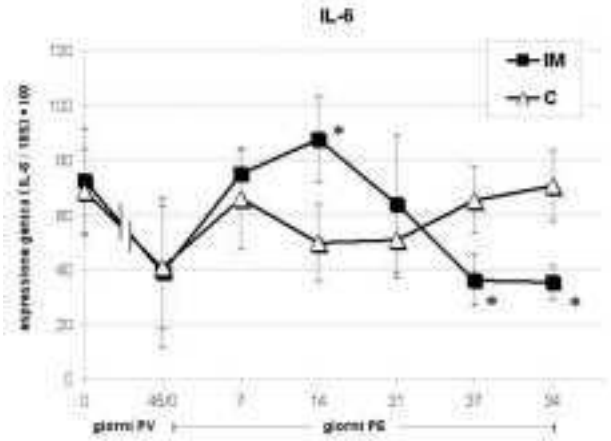


Fig. 5. Espressione genica di *IL-6* in PBMC di suini vaccinati (IM) contro la PRRS e non vaccinati (C). Dati riportati come valori medi ±SD (Deviazione Standard). PV: post-vaccinazione, PE: post-esposizione, * = p<0.05.
Fig. 5. *IL-6 gene expression levels in PBMC of PRRS vaccinated (IM) and unvaccinated (C) pigs. Data shown as mean values ±SD (Standard Deviation). PV: post-vaccination, PE: post-exposure, * = p<0.05.*

DISCUSSIONE

Durante l'infezione naturale da PRRSV si verificano importanti cambiamenti nei livelli degli ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) e dell'asse somatotropo nonché dell'IL-6, citochina coinvolta in maniera importante nell'attivazione ipofisaria (9).
Un aumento del cortisolo è necessario per il controllo dell'infiammazione e per lo spegnimento della risposta flogistica che viene iniziata e sostenuta dalla secrezione di citochine infiammatorie. Durante l'infezione da PRRSV, negli animali non vaccinati si assiste fin dall'inizio dell'esposizione ad una caduta dei livelli di cortisolo mentre negli animali vaccinati i livelli rimangono a livelli significativamente superiori nelle prime due settimane post-esposizione.
I risultati sia in fase post-vaccinazione che post-esposizione evidenziano che l'infezione da PRRSV non attiva in maniera intensa l'asse IIS probabilmente non inducendo un fenomeno flogistico abbastanza intenso da giustificare un picco di cortisolo, ed inoltre confermano che in animali non vaccinati infettati si verifica addirittura una significativa riduzione della produzione di cortisolo al di sotto di valori basali (10); al contrario, la vaccinazione appare in grado di indurre una attivazione dell'asse IIS e, conferendo una maggiore responsività infiammatoria, fa si che negli animali vaccinati ed infettati si mantenga un livello di cortisolo più duraturo.
Attualmente nessun gruppo di ricerca si era interessato di analizzare i livelli plasmatici del GH in corso di infezione virale da PRRSV. L'infezione da PRRSV negli animali non vaccinati, oltre a determinare soppressione dei livelli di cortisolo, non comporta nemmeno un incremento di quelli del GH, deponendo per una inadeguata attivazione ipofisaria.

Al contrario, negli animali vaccinati il consistente e duraturo incremento di GH nelle prime due settimane di infezione giustifica un meccanismo di più efficiente risposta innata. Diversi lavori dimostrano infatti che il GH (11, 12) stimola la risposta immunitaria innata mediante l'aumento dell'attività delle cellule NK e dei fagociti infiammatori.
Gli andamenti dell'IL-6 e quelli del GH risultano sovrapponibili e, d'altra parte, l'IL-6 è in grado di stimolare la secrezione di ACTH, PRL e GH (13).
Gli animali controllo non mostrano un adeguato incremento di IL-6 rispetto ai vaccinati ed il suo livello di espressione scende direttamente dopo 7 giorni dall'esposizione e si mantiene a bassi livelli fino a 21 giorni, quando risale portandosi a valori significativamente differenti rispetto ai vaccinati.
Il ridotto incremento di IL-6 nella prime settimane di infezione conferma la scarsa attivazione della risposta innata mentre l'elevato livello di tale citochina dopo 21 giorni di infezione è da collegarsi all'attivazione policlonale dei linfociti B mediata dal virus (14) ed ad un inibizione Th1, ma è altrettanto vero che in fase tardiva un elevato livello di IL-6 è responsabile della cronicizzazione dell'infiammazione (15).
L'attività antinfiammatoria dei glucocorticoidi (GCs) secreti in seguito all'attivazione dell'asse IIS rappresenta il maggior feedback di controllo sull'infiammazione. Ridotti livelli di cortisolo o una ridotta sensibilità periferica ai GCs possono drammaticamente risultare in una maggiore suscettibilità e gravità all'infezione e maggior rischio di mortalità: diverse evidenze hanno dimostrato che, seppure dipendente dal tipo di patogeno, dalla dose e dalla specie, la soppressione dell'attivazione dell'asse HPA attraverso diversi meccanismi, è correlata all'aumento della gravità della malattia che consegue all'infezione (16, 17).
In tale quadro neuroendocrino, il basso livello di cortisolo ed i persistenti livelli di TNF-α (dati mostrati in un altro lavoro) e di IL-6 spiegano la persistenza dell'infiammazione ed un mancato controllo del danno infiammatorio negli animali non vaccinati rispetto agli animali vaccinati.
I dati ottenuti evidenziano che, durante l'infezione naturale da PRRSV e la comparsa di malattia associata, una incompleta ed alterata attivazione della risposta neuroendocrina, insieme alla inadeguata risposta flogistica di tipo innato, possono sostenere non solo una tardiva attivazione dell'immunità specifica ma anche una "persistenza" dell'infiammazione, il danno tessutale e, di conseguenza, la gravità della malattia. Inoltre, si è evidenziato che la vaccinazione, è in grado di attivare anche una risposta neuroimmunitaria che può spiegare sia una maggiore reattività immunitaria innata che un maggior controllo della durata e del danno infiammatorio concretabile con il riscontro di una ridotta gravità clinica, sia in termini di parametri sistemici che respiratori, anche nel caso di infezione naturale da virus eterologo.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano come l'analisi degli andamenti plasmatici di ormoni ad azione sistemico-metabolica possa fornire importanti informazioni da affiancare ai tra-

dizionali *markers* di infezione virale, e confermano come l'attivazione del sistema neuroendocrino sia parte integrale nel sostegno e nel controllo della risposta adattativa immunitaria nei confronti di un agente patogeno.
Inoltre, ulteriori informazioni ottenute dall'approccio neuro-immunitario allo studio delle infezioni potranno permettere di utilizzare adeguatamente tali parametri ormonali anche nel monitoraggio del benessere animale e nella valutazione dell'impatto di infezioni sulla crescita e sulle performance produttive degli animali, oltre che sulla loro efficienza immunitaria.

BIBLIOGRAFIA

Borghetti P. Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Saleri R., Corradi A. Martelli P. (2006) "Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets". Vet Res Commun. 30 (suppl), 227-230.

Borghetti P., De Angelis E., Saleri R., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Mocchegiani E., Martelli P. (2006) "Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes". Vet Immunol Immunopathol. 110, 17-25.

Berczi I, Bertok I., Chow D.A. (2000) "Natural immunity and neuroimmune host defense". Ann NY Acad Sci. 917, 248-257.

Haeryfar S.M.M., Berczi I. (2001) "The thymus and the acute phase response". Cell Mol Biol. 47, 145-156.

Sternberg E.M. (2006) "Neural regulation of innate immunity: a coordinated non-specific host response to pathogens". Nat Rev Immunol. 6, 318-328.

Webster J.I., Sternberg E.M. (2004) "Role of the hypotalamo-pituitary-adrenal axis, glucocortisoids and glucocorticoid receptors in the toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products". J Endocrinol. 181, 207-221.

Martelli P., Rosina S., Bottarelli E., Gozio S., Ferrari L., De Angelis E., Borghetti P. (2007) "Efficacy of Eu-PRRS attenuated vaccine to control respiratory disease in pigs naturally exposed to a virulent heterologous field virus". "5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases", Krakow, Poland, 24-27 june 2007, 204.

Martelli P., Cordioli P., Alberali L.G., Gozio S., De Angelis E., Ferrari L., Lombardi G., Borghetti P. (2007) "Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain". Vaccine 25, 3400-3408.

Hopkins S.J. (2007) "Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration". Acta Biomed, 78; suppl 1: 231-247.

Sutherland M.A., Niekamp S.R., Johnson R.W., Van Alstine W.G., Salak-Johnson J.L. (2007) "Heat and social rank impact behavior and physiology of PRRS-virus-infected pigs" Physiol Behav 90, 73-81.

Dorskind K. e Horseman N.D. (2000) "The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I and thyroid hormones in lymphocyte development and functions: insights from genetic model of hormone and hormone receptor deficiency". Endocr Rev. 21; 292-312.

Heemsherk V.H., Daemen M.A.R.C., Buurman W.A. (1999) "Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation". Cytokine Growth Factor Rev. 10, 5-14.

Savino V. e Dardenne M. (2000) "Neuroendocrine control of thymus physiology". Endocr Rev. 21, 421-443

Royaee A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Scnitzlein W.M., Zuckermann F., Lunney J.K. (2004) "Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination". Vet Immunol Immunopathol. 102, 199-216.

Maggio M., Guralnik J.M., Longo D.L., Ferrucci L. (2006) "Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway". J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 61, 575-584.

Bayley M., Engler H., Hunzeker J., Sheridan J.F. (2003) "The hypothalamic-pituitary adrenal axis and viral infection". Viral Immunol. 16, 141-157.

Ashare A., Powers L., Butler N.S., Doerschug K.C., Monick M.M., Hunninghake G.W. (2005) "Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis". Am J Phisiol Lung Cell Mol Physiol, 288, 633-640.

MYCOPLASMA SPP. NELL'ARTRITE DEL SUINO

MYCOPLASMA *SPP. IN ARTHRITIS IN SWINE*

SIMONETTA APPINO@, LORIS ALBORALI#, PAOLA PREGEL*,
FRANCO GUARDA*§

*@ Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari; # Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia; * Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino; § Centro di referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Torino*

Parole chiave: Mycoplasma, artrite, suino
Key words: Mycoplasma, arthritis, swine

Riassunto. Sono stati esaminati quarantuno campioni ottenuti da articolazioni di suini che erano stati regolarmente macellati, interessate da forme artritiche, prevalentemente caratterizzate da polisierosite – poliartrite, al fine di valutare la presenza di *Mycoplasma* spp.
I reperti anatomo-patologici raccolti comprendevano forme acute e sub-acute sierose, sieroemorragiche o fibrinose, con accumulo di liquido articolare e fibrina, anche di notevole entità (rigonfiamento), ma senza erosione evidente della superficie articolare, e/o moderata proliferazione villosa della membrana sinoviale.

Summary. Forty-one synovial fluids have been collected from regularly slaughtered swine clinically affected by sierositis, arthritis - polyarthritis, in order to evaluate the presence of *Mycoplasma* spp.
Macroscopical lesion were characterised by sub-acute to acute sierositis associated to an increase of synovial fluid and fibrin, but without signs of superficial erosions. A mild proliferation of synovial membrane was present.

Introduzione

L'artrite reumatoide (RA) è descritta in cani di piccola taglia di età compresa tra i 5 e i 6 anni, più raramente nei gatti. Clinicamente l'animale può manifestare dolore lieve o marcato, zoppia e atrofia muscolare. Le articolazioni colpite sono generalmente rigonfie.
Nel suino il fenomeno è reso visibile dalla presenza di polisierosite o di artrite acuta e sub-acuta siero-fibrinosa, a volte emorragica, che giunge ad essere fibrinoso-purulenta nei casi cronici. La malattia si segnala nei suini di peso compreso tra 40-100 kg e porta a gravi perdite economiche. La patogenesi dell'artrite reumatoide è progressiva e caratterizzata da due eventi consecutivi e connessi:
un'infiammazione primaria causata da agenti esogeni - virus, micoplasmi o batteri -

che alterando i tessuti dell'ospite inducono un'abnorme espressione dei meccanismi di difesa (iperproduzione anticorpale = autoimmunità);
il perpetuarsi del meccanismo e la localizzazione articolare del fenomeno (affinità tissutale).
Tra i microrganismi sospettati di essere parte in causa nel meccanismo dell'artrite, il principale è *Mycoplasma* spp. e, sebbene il meccanismo con cui questo microrganismo interagisce con la cellula ospite per indurre il fenomeno "autoimmune" non sia ancora del tutto chiaro, è ormai certo che alcune specie sono in grado di plasmare geneticamente la propria superficie e questo permette loro di persistere nell'ospite inducendo una modulazione della risposta immunitaria (induzione del danno infiammatorio = teoria del superantigene).
In particolare: *M. bovis* nel bovino, *M. capricolum* nei ruminanti, *M. hyosynoviae* e *M. hyorhinis* (alcuni ceppi) nel suino, *M. synoviae* nei volatili, *M. arthritidis* nei roditori (Simecka *et al*., 1992) sarebbero in grado di produrre un aumento della immunità cellulo-mediata nell'ospite. Si sospetta che *M. fermentans* sia l'unico agente associato ad artrite reumatoide nell'uomo; esso è stato, infatti, isolato da individui che presentavano artrite e contemporaneo aumento dell'immunità cellulo-mediata (Williams *et al*., 1970).
La sottostima della presenza di *M. fermentans* nei casi di artrite reumatoide umana è certamente legata alle difficoltà tecniche di isolamento del microrganismo. A seguito dell'introduzione di metodiche più sensibili e specifiche, come PCR ed ELISA (Garner *et al*., 2000), alcuni ricercatori hanno evidenziato che fino all'88% dei pazienti affetti da RA presentava DNA di *M. fermentans* nel liquido sinoviale, ma tale microrganismo era altresì presente in molti individui sani (Johnson *et al*., 2000; Ditty *et al*., 1999; Pettersson *et al*., 1996).
Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare la presenza di *Mycoplasma* nel liquido sinoviale e nel materiale articolare prelevato da suini con artrite e di caratterizzare alcuni dei ceppi coinvolti.

Materiali e metodi

Sono stati prelevati 41 campioni di liquido sinoviale da suini regolarmente macellati, che presentavano lesioni artritiche da sierose a sierofibrinose. Gli animali erano di età compresa tra 20 e 60 giorni di età e provenivano da allevamenti problema con lesioni articolari, a ciclo aperto e chiuso.
Ciascun campione di liquido sinoviale è stato sottoposto a:
1. valutazione mediante PCR di *Mycoplasma* spp., procedendo all'amplificazione di un frammento di 771 bp del gene 16s rRNA genere-specifico di micoplasma, seguendo le condizioni descritte da Van Kuppeveld (1992). Per ogni amplificazione sono stati altresì utilizzati come controlli positivi opportuni isolati di riferimento e, come controllo negativo, H2O sterile. La mix di amplificazione (50 µl) conteneva: 10 mM tris HCl, 50m mM KCl pH 9, 0.1 % Triton X-100, 200 µM di ogni base, 100 pM di ogni *primer* MGSO e GPO1.

2. esame routinario batteriologico dell'articolazione e virologico della carcassa secondo le linee guida OIE.
Alcuni prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a sequenziamento del DNA, allo scopo di paragonarne la sequenza con quelle presenti in banca dati.

Risultati

Dodici dei campioni esaminati sono risultati positivi alla prova in PCR per *Mycoplasma* spp. L'esame batteriologico dell'articolazione ha permesso di mettere in evidenza in diversi casi *E. coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus suis II*. L'esame virologico delle carcasse ha messo in evidenza una positività elevata a PRRSV e, solo in sporadici casi, la presenza di PCV2.
Il sequenziamento di due campioni positivi ha permesso di evidenziare una omologia del 98,7% con il gene per il 16S rRNA di *Mycoplasma hyopharyngis* e del 99,4% con l'analogo gene di *Mycoplasma hyorhinis*.

Discussione

Nelle fasi preliminari della ricerca è stata esaminata anche la possibilità di utilizzare l'esame colturale, tuttavia tutti i campioni analizzati sono risultati negativi. Ricerche analoghe effettuate in medicina umana hanno anch'esse evidenziato l'impossibilità di isolamento di *Mycoplasma* nell'artrite autoimmune. Anche la difficoltà ad amplificare il materiale in esame è probabilmente dovuta al fatto che solo una piccola parte del DNA di *Mycoplasma* è eventualmente presente nel liquido sinoviale esaminato. Verosimilmente, tale microrganismo non è presente, quindi isolabile, dalle articolazioni, e tanto meno sono evidenziabili anticorpi diretti contro di esso, ma si rinviene soltanto parte del suo genoma. Proprio questo sarebbe il fattore che scatena il meccanismo autoimmune. Il sequenziamento di alcuni campioni positivi ha permesso di caratterizzare due ceppi di *Mycoplasma* spp. coinvolti nel determinismo della patologia. La loro presenza potrebbe rappresentare la testimonianza di infezioni pregresse. Il suino potrebbe pertanto rappresentare un indicatore ambientale della presenza di microrganismi nelle acque, potenzialmente responsabili di analoghe patologie nell'uomo, ed essere quindi preso a modello per lo studio della patologia comparata da *Mycoplasma* spp.

Bibliografia

Ditty S.E., Connolly M.A., Li B.J. (1999) "Mycoplasma orale has a sequence similar to the insertion-like sequence of M. fermentans". Mol. Cell. Probes 13, 183-189.
Garner C.M., Hubbold L.M., Chakraborti P.R. (2000) "Mycoplasma detection in cell coltures: a comparison of four methods." Brit. J Biomed. Scie. 57, 295-301.

Johnson S., Sidebottom D., Brukner F., Collins D. (2000) “Identification of Mycoplasma fermentans in synovial fluid samples from arthritis patiens with inflammatory desease.” J. Clin. Microb. 38, 90-93.

Pettersson B., Leitner T., Ronaghi M., Bolske G., Uhler M., Johansson K.-E. (1996) “Phylogeny of the mycoplasma mycoides cluster as determined by sequence analysis of the 16s rRNA genes from the two rRNA operons.” J. Bacteriol. 178, 4131-4142.

Silman A.J., Pearson J.E. (2002) “Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis.” Arthritis Res. 4 Suppl 3, S265-S272.

Simecka J.W., Davis J.K., Davidson M.K., Ross S.E., Städtlander C.T.K.-H., Cassell G.H. (1992) “Mycoplasma diseases of animals.” In Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., Baseman J.B. (eds.) Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Washington D.C., American Society for Microbiology: 391-415. p. 391-415.

Van Kuppeveld F.J.M., Van der Logt J.T.M., Angulo A.F. (1994) “Genus and specie specific identifications of Mycoplasma by 16s RNA amplification” Apply Env. Microbiol. 60, 953-959.

Williams M.H., Brostoff J., Roitt I.M. (1970) “Possible role of Mycoplasma fermentans in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.” Lancet ii, 277-280.

DESCRIZIONE DI TRE CASI DI TERATOLOGIA NEL SUINO

DESCRIPTION OF THREE CASES OF TERATOLOGY IN SWINE

RICCARDO PAROLA, FRINE ELEONORA SCAGLIONE, FRANCO GUARDA
Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Università degli studi di Torino, centro di referenza di patologia comparata Bruno Maria Zaini

Parole chiave: teratologia, suini, gemelli congiunti, difetti congeniti
Key words: teratology, swine, conjoined twins, congenital defects

Riassunto. I difetti congeniti sono quelle anomalie presenti alla nascita derivanti da errori intervenuti durante l'accrescimento dell'embrione. (Noden and de Lahunta, 1985) Sebbene molte mostruosità siano descritte in letteratura, spesso risulta difficile risalire alla causa eziologica che ha provocato la malformazione.
Vengono presentati tre casi di mostruosità in suini: due mostri doppi (uno xifopago parassita con assenza dei tratti superiori, testa unica e sette zampe ed un mostro doppio con parapagia superiore e duplicazione del cinto pelvico) ed un ciclocefalo con sinoftalmo e proboscide.

Abstract. Defects that are present at birth are known as congenital abnormalities and they arise from error during development (Noden and de Lahunta, 1985). Even if many congenital abnormalities affecting different species are widely described in the literature, there are no information concerning genetic or environmental aetiology.
Three cases of swine with congenital malformation are presented: two conjoined twins (a case of heteropagus monocephalus with seven legs and a monocephalus with duplication of the caudal region) and a ciclocephalus.

Introduzione

La teratologia è lo studio delle mostruosità corporee congenite. Tale scienza ha da sempre destato grande interesse e curiosità sebbene spesso risulti difficile risalire alla causa eziologica che ha provocato la malformazione.
La maggior parte delle anomalie congenite è dovuta a difetti genetici, mentre soltanto il 5-6% circa delle cause è attribuibile ad agenti esterni che concorrerebbero con fattori genetici ed elementi sfavorevoli intrauterini.
Gli agenti esterni che possono avere effetto teratogeno possono essere rappresentati da agenti fisici (radiazioni ionizzanti), biologici (infezioni) e chimici (farmaci, tossici…).
In teratologia i mostri doppi sono classificati in due categorie: **autositi** quando sono costituiti da due embrioni che hanno lo stesso grado di sviluppo e provvisti ognuno di un apparato circolatorio capace di permettere la loro sopravvivenza; **onfalositi** allorché uno dei due risulti più piccolo (parassita), sprovvisto di cuore (acardia) o con un cuore

rudimentale, e risulta perciò innestato sull'altro embrione che gli assicura il trofismo.
Tra gli autositi, a seconda della disposizione e dei tratti di fusione dei due embrioni, si possono distinguere: una parapagia (fusione degli embrioni lungo l'asse parallelo del corpo), una cucipagia (fusione degli embrioni a livello della testa, del torace o del bacino con assi vertebrali opposti), una onfalopagia (le strutture fuse riguardano porzioni più o meno ampie della parete toracica ed epigastrica) e mostri doppi eusonfali (in cui ognuno dei due embrioni ha un proprio ombelico ma vi è fusione a livello craniale o sacro-coccigeo).
Tra gli onfalositi se ne distinguono due tipi: xifopaghi e endocimi.
Gli xifopaghi parassiti sono mostri nei quali l'embrione parassita è più o meno ridotto, costituito dai soli tratti superiori od inferiori, ed è inserito nell'embrione completo a livello della regione epigastrica. Questi mostri doppi possono assumere morfologia diversa a seconda dello sviluppo, della posizione e dell'atteggiamento del parassita. Alcune volte l'embrione parassita è ridotto alla testa ed al torace ed assume con l'embrione sviluppato la forma di una y, altre volte è costituito dal solo tronco e dagli arti pelvici ed ha la forma di una λ.
Nei mostri parassiti endocimi, l'embrione più piccolo è spesso rudimentale e completamente disposto entro l'altro, nell'ambito della cavità toracica o addominale, o situato nello spessore di un organo. Ciò costituisce la presenza di un feto in un feto. (Pelagalli e Castaldo, 1998)
Tra i mostri singoli sono presenti i mostri ciclocefali. Tale rara malformazione è dovuta ad una alterata induzione della placca precordale con anomalie profonde nelle strutture frontali e atrofia delle porzioni anteriori del cervello.

Materiali e metodi

In questo articolo vengono presentati tre casi di mostruosità in suini: due mostri doppi ed un mostro ciclocefalo.

Caso 1
Nell'ambito di una nidiata da una scrofa primipara, incrocio in F1 di Landrace per via paterna e Large White per via materna, fecondata con seme di Duroc Italiano sono stati osservati 7 suinetti di cui 6 vivi, vitali e normoconformati ed uno con aspetto di mostro doppio. Il caso presentato (fig 1) riguarda un suinetto femmina xifopago parassita con assenza dei tratti superiori morto subito dopo la nascita. All'esame esterno il soggetto si presentava come gemelli congiunti asimmetrici uniti a livello epigastrico. Presentava una testa unica; sette zampe (di cui quattro ben formate, due di dimensioni ridotte ma complete ed una in forma di abbozzo).
A livello del cranio è stato possibile osservare palatoschisi e macroglossia.
All'esame esterno non sono state osservate anomalie della gabbia toracica ma a livello di addome è stato possibile evidenziare un solo cordone ombelicale, due addomi con cinto pelvico completo, assenza di un orifizio anale e di organi genitali esterni ma presenza di un abbozzo di coda nel gemello parassita.

Fig. 1. Gemelli congiunti: xifopago parassita con assenza dei tratti superiori
Fig. 1. *Conjoined twins: heteropagus monocephalus*

All'esame interno non è stata osservata duplicazione degli organi a livello della gabbia toracica. I polmoni sono risultati positivi alla prova docimasica confermando che la morte è avvenuta dopo la nascita.
In cavità addominale erano presenti un solo stomaco ma due tratti intestinali di cui uno completo ed uno solo parzialmente formato e collegato a quello del gemello autosita. Il fegato consisteva in un'unica massa epatica derivante dalla fusione di due organi ed inoltre presentava due vescichette biliari.
Sebbene fossero presenti due cinti pelvici completi, è stato possibile osservare una sola colonna vertebrale senza anomalie riferibile al gemello di maggiori dimensioni.

Caso 2
Il secondo suino (fig. 2) consiste in un mostro doppio con parapagia superiore o cefalica. Tali mostri, in cui è presente monocefalia, sono detti lambdoidei in quanto il loro aspetto ricorda la lettera λ dell'alfabeto greco.
Nel caso da noi riportato è stato possibile osservare una assenza degli arti anteriori laterali ma la presenza di due cinti pelvici completi e ben formati (arti posteriori raddoppiati). La duplicità dei tratti caudali comporta la divisione di porzione dell'intestino e degli organi genitali.
Sebbene nella porzione craniale sia possibile osservare un cranio normoconformato, è altresì possibile osservare anencefalia, una malformazione del sistema nervoso. Tale anomalia è caratterizzata da limitato sviluppo della porzione cefalica del tubo neurale con mancata chiusura della doccia neurale.
L'encefalo di tali soggetti spesso appare formato da una piccola massa rudimentale. La malformazione è accompagnata da una ridotta evoluzione delle ossa della volta del cranio, per un difetto di induzione da parte del tubo neurale, per cui sulla linea media-

na sì ha cranioschisi ed il tessuto nervoso non è ricoperto né da formazioni ossee né da strutture cutanee. Il Sistema nervoso centrale è infatti visibile esternamente dal momento che l'epidermide si continua direttamente con il tessuto nervoso mantenendo gli stessi rapporti che ha l'epiblasto con la doccia neurale al momento della loro differenziazione.

Fig. 2. Gemelli congiunti: parapagia superiore con duplicazione della regione caudale
Fig. 2. *Conjoined twins: monocephalus with duplication of the caudal region*

Caso 3

Il terzo suino (Fig 3) presentava una alterazione del sistema nervoso classificata come ciclocefalia. Tale rara malformazione è dovuta ad una alterata induzione della placca precordale con anomalie profonde nelle strutture frontali e atrofia delle porzioni anteriori del cervello. Il telencefalo in questi casi non è diviso in due emisferi e la sua unica cavità comunica attraverso un solo canale con il terzo ventricolo. Le altre strutture cerebrali hanno le caratteristiche della microcefalia. In conseguenza di ciò, o mancano gli occhi, o si ha presenza di un solo occhio al centro della fronte (monoftalmo) o, come nel caso presentato, la fusione dei due globi oculari in una sola orbita (sinoftalmo). Sono inoltre assenti tutte le strutture nasali cioè la parte cutanea, le fosse nasali, i bulbi ed i nervi olfattivi.
A livello della radice del naso è possibile osservare una proboscide composta da una formazione cutanea cilindrica.

Considerazioni e conclusioni

Nell'ambito delle scienze veterinarie sono stati descritti casi di gemelli congiunti in tutte le specie.

Fig. 3. Ciclocefalo
Fig. 3. *Ciclocephalus*

La classificazione di tali anomalie risulta ancora tutt'oggi difficile a causa delle differenze macroscopiche determinate dalla posizione e dalla differente ampiezza dei rapporti tra i gemelli. I mostri doppi possono essere la risultante della fusione più o meno completa di due embrioni (Thompson et al., 1991) derivanti da uno stesso uovo, o dalla duplicazione di un solo embrione (Baron et al.,1990) Non è ancora stata chiarita la patogenesi dei mostri doppi parassiti (Machin, 1993).
I gemelli congiunti eteropaghi sono rari e sono circa 1 o 2 per milione di nati vivi nella specie umana(Hwang et al., 1996). La maggior parte di tali mostruosità riportate in letteratura presenta una unione del gemello parassita a livello della regione ipogastrica o soprapubica. La giunzione a livello ipogastrico, come in uno dei casi da noi riportati, risulta piuttosto rara (Oxcan et al., 2000)
Secondo alcune teorie tale tipo di mostruosità risulta da una ischemia atrofica del gemello monozigote congiunto ad uno stadio di gestazione precoce. (Oxcan et al., 2000 ; Raynal et al, 2001). In medicina umana risulta tuttavia riportato un caso di gemelli dizigotici (Logrono et al, 1997) Come osservato in diversi casi di mostruosità doppie in medicina umana, erano presenti due cinti pelvici completi ma assenza di una seconda colonna vertebrale o anche solo un abbozzo di questa (Potter, 1961). Avendo ritrovato il suinetto morto in sala parto, non è stato possibile osservare la presenza di movimenti spontanei al cinto pelvico soprannumerario ed eseguire esami neurologici per verificare la presenza di risposte a stimoli esterni diretti al gemello di maggiori dimensioni o a quello parassita come invece descritto in alcuni casi in medicina umana (Joubert and Stephanov, 1983; Tan et al., 1974).
Non sono state invece evidenziate anomalie scheletriche del gemello parassita per quanto riguarda le zampe posteriori. Era invece presente una evidente malformazione e minor crescita della zampa anteriore del gemello stesso. Tale reperto è correlato alla sua posizione ed al rapporto con il gemello di maggiori dimensioni.

Come sopra descritto non era presente un orifizio anale nel gemello parassita, sebbene fosse presente un abbozzo della coda e una porzione di intestino. Tale reperto non deve stupire (Joubert and Stephanov, 1983; Mabogunje and Lawrie, 1978) poichè in analoghi casi in medicina umana è stato possibile evidenziare lo stesso reperto anche quando nella cavità pelvica del gemello parassita erano presenti un numero maggiore di organi ad uno stadio di sviluppo avanzato. (Husain et al., 1989; Mabogunje and Lawrie, 1978; Potter, 1961)

Nella faccia tutti gli organi si originano come formazioni pari che si saldano sulla linea mediana. La cavità orale viene pertanto ad essere delimitata dalla fusione dei processi mandibolari con quelli mascellari. Risulta inoltre molto importante la fusione dei processi nasali mediali poiché un suo arresto determina gravi malformazioni del labbro superiore o del palato. I processi palatini inoltre, con lo sviluppo, assumono la definitiva posizione orizzontale e si avvicinano l'un l'altro fondendosi sulla linea mediana a formare il palato. Nel caso da noi riportato è stato possibile evidenziare una palatoschisi dovuta alla difettosa saldatura dei processi palatini che interessava sia il palato duro che quello molle. Questo tipo di malformazione, frequente negli animali e nei bambini, ma mai segnalata in casi di gemelli doppi xipofagi, avrebbe comunque reso impossibile la vita al suinetto dal momento che ne sarebbe stata compromessa la prensione del latte e successivamente degli alimenti. Allo stesso modo, la macroglossia avrebbe portato l'animale a gravi difetti di accrescimento, se non a morte.

I gemelli congiunti autositi possono presentare una duplicazione a livello della parte anteriore o posteriore del corpo. Qualora la porzione craniale risulti duplicata è possibile osservare due teste e pertanto si parlerà di mostri dicefali. Quando invece si ha la regione caudale duplicata (dipago) si potranno osservare una parziale o completa duplicazione del cinto pelvico (Corbera et al 2003) come nel caso da noi descritto.

Secondo quanto riportato in letteratura tale malformazione risulta spesso accompagnata da atresia anale e mancanza della coda (Saperstein 2002). Nei suinetti invece la conformazione della coda risulta in entrambi i cinti pelvici normale sebbene non sia stato possibile verificare la presenza di altre anomalie a livello urogenitale.

La mortalità associata alle anomalie congenite risulta proporzionale alla gravità della malformazione stessa. In nessuno dei casi da noi osservati sarebbe stata comunque possibile la sopravvivenza dei suinetti a causa del gran numero e della gravità delle malformazioni presenti.

Bibliografia

Baron B.W., Shermeta D.W., Ismail M.A., Ben-Ami T., Yousefzadeh D., Carlson N., Amarose A.P., Esterly J.R. (1990) "Unique anomalies in cephalothoracopagus janiceps conjoined twins with implications for multiple mechanisms in the abnormal embryogenesis." Teratology,; 41, 9–22.

Corbera J.A., Arencibia A., Morales I., Gutierrez I. (2005) "congenital duplication of the caudal region (monocephalus dipygus) in a kid goat" Anat. Histol. Embryol, 34, 61-63

Husain AN, Muraskas J, Lambert G, Dado D, Lynch J. (1989) "Parasitic conjoined twins with omphalocele and tetralogy of Fallot." Pediatr Pathol. 9(3), 321-8.

Hwang E., Han S., Lee J. (1996) “An unusual case of monozygotic epigastric heteropagus twinning.” J Pediatr Surg; 31, 1457- 1460.
Joubert M., Stephanov S. (1983) “Successful removal of a partial Siamese twin with a carbon dioxide laser.” S Afr Med J, 64 913–914.
Logrono R., Garcia-Lithgow C., Harris C. (1997) “Heteropagus conjoined twins due to fusion of two embryos: report and review.” Am J Med Genet, 73, 239- 243.
Mabogunje O.A., Lawrie J.H. (1978) “The heteropagus conjoined twins of NDU Sule, Nigeria.” Clin Pediatr (Phila). 17(11), 861-863.
Machin G.A. (1993) “Conjoined twins: Implications for blastogenesis.” Birth Defects Orig Artic Ser. 29(1), 141-179.
Noden and de Lahunta (1985) “The embryology of domestic animals, development mechanism and malformations”, Baltimore, Williams and Wilkins.
Oxcan C., Ergun O, Guclu C. (2000) “An unusual case of epigastric heteropagus: parasite with rudimentary heart.” J Pediatr Surg, 35, 1523-1525.
Pelagalli G.V., Castaldo L. (1998) “Embriologia, morfogenesi e anomalie dello sviluppo”. Napoli, Gnocchi.
Potter E.L. (1961) “ Multiple pregnancies and conjoined twins.” In Potter EL ‘‘Pathology of the Fetus and Infant.’’ Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc., 3– 33.
Raynal P., Petit T., Ravasse P. (2001) “Un cas rare de jumeaux he´te´ropages e´pigastriques. “ J Gynecol Obstet Reprod, 30, 65 - 69.
Saperstein G. (2002) “Congenital defects and hereditary disorder in ruminants” Large Animal Internal Medicine 3rd edn, st Louis, Mosby, 1465-1555
Tan K.L., Joseph V.T., Chiang S.C. (1974) “An unusual heteropagus.” Aust Paediatr J 10, 373–377.
Thompson M.W., McInnes R.R., Willard H.F.(1991) in Thompson & Thompson ‘‘Genetics in Medicine,’’ 5th Ed., Philadelphia, W.B.Saunders, 389–391.

DIAGNOSI DI PMWS IN ITALIA: RISULTATI DI 18 MESI DI ATTIVITÀ

DIAGNOSIS OF PMWS IN ITALY: RESULTS OF 18 MONTHS OF ACTIVITY

GIUSEPPE SARLI, FABIO OSTANELLO, FEDERICO MORANDI, LAURA FUSARO, BARBARA BACCI, ARRIGO NIGRELLI[1], LORIS ALBORALI[2], MICHELE DOTTORI[3], FAUSTO VEZZOLI[4], GIUSEPPE BARIGAZZI[5], LAURA FIORENTINI[6], VITTORIO SALA[7], GIORGIO LEOTTI[8]

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna – IZS Lombardia e Emilia-Romagna sezioni diagnostiche di Mantova[1], Brescia[2], Reggio Emilia[3], Lodi[4], Parma[5], Forlì[6] - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano[7] - Merial Italia[8]

Parole chiave: PMWS, PCV2, suino, istopatologia, immunoistochimica, diagnosi.
Key words: PMWS, PCV2, pig, histopathology, immunohistochemistry, diagnosis.

Riassunto. L'attività diagnostica per PMWS, pianificata dal nostro gruppo di lavoro e presentata al meeting dello scorso anno, ha raggiunto 18 mesi di attività su un complessivo di 64 allevamenti sottoposti ad indagine per un totale di 229 suini esaminati. In 48 allevamenti è stata conclusiva la diagnosi di PMWS in base al protocollo impiegato; tra queste in 21 aziende, tutti i soggetti esaminati presentavano un percorso diagnostico conclusivo per PMWS mentre nelle restanti 27 non tutti i soggetti, tra quelli del gruppo esaminato, avevano evidenza di PMWS. Il protocollo applicato ha previsto l'abbinamento della dimostrazione di lesioni istologiche peculiari (linfoidi e polmonari), complessivamente non riscontrate in altre malattie del suino, con una metodica specifica per l'evidenziazione di PCV2. Il test può essere considerato ad elevata potenzialità diagnostica se impiegato sul gruppo, mentre sul singolo essa è minore.

Summary. In 18 months of activity our team has tested 64 farms (altogether 229 pigs) for PMWS. PMWS was diagnosed on 48 farms, in 21 of which the total number of the examined subjects had lesions of PMWS, whereas in the remaining 27 only some animals showed PMWS. The protocol applied is based on the combination of the typical histological lesion in lymphoid and lung tissues with the immunohistochemical assessment of PCV2. The test revealed stronger when applied to a group of animals than on a single pig.

Introduzione

Le porcine circovirus diseases (PCVDs), sono malattie sostenute dal porcine circovirus tipo 2 (PCV2), virus a DNA circolare a singolo filamento. Le PCVDs che comprendono la post-weaning multisystemic wasting sindrome (PMWS), la sindrome dermatite

nefrite (PDNS), il complesso delle malattie respiratorie del suino – PRDC (inclusa la polmonite proliferativa e necrotizzante - PNP), disordini riproduttivi, linfadenite necrotizzante ed enterite granulomatosa (Harding, 2004; Chae, 2005, Ségales et al., 2005), riscuotono molta attenzione nel panorama scientifico internazionale relativo alla patologia suina. Per tutte queste malattie l'approccio diagnostico è peculiare: è necessario l'esame istologico con dimostrazione dell'agente eziologico. Infatti, poiché il PCV2 è ampiamente presente nelle popolazioni di suino, l'iter diagnostico che evidenzia anticorpi sierici o la presenza del genoma virale in estratti tissutali non è conclusivo di una specifica malattia ma solo di infezione da PCV2 (Sgalés et al., 2005; Chae, 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005).
Seppure disponibili sono le segnalazioni della presenza di PMWS in Italia (Marcato et al., 1999; Martelli et al., 2000, Fiorentini et al., 2004, Sarli et al., 2007), non si hanno informazioni precise sulla prevalenza della malattia negli allevamenti, a fronte di una sieroprevalenza dell'infezione da PCV2 molto elevata (Sala et al., 2000).
Dall'ottobre 2006 è operativo un gruppo di lavoro organizzato da MERIAL Italia (Sarli et al., 2007) che attualmente sta conludendo il percorso diagnostico per PMWS e sta iniziando quello per altre PCVDs.
La presente segnalazione vuole riassumere i risultati sull'attività di lavoro per PMWS alla luce del protocollo istologico e delle modalità di campionamento impiegate.

Materiali e metodi

L'individuazione della casistica, la modalità di campionamento e le indagini istologica ed immunoistochimica sono state condotte secondo quanto già specificato (Sarli et al., 2007). Complessivamente sono state sottoposte al protocollo diagnostico 64 aziende per un totale di 229 suini esaminati.
In figura 1 sono riportati i criteri di interpretazione istologica ed immunoistochimica applicati per la diagnosi.
Per ciascun allevamento sono state raccolte, mediante un questionario anamnestico, informazioni relative alle percentuali di morti, scarti ed infezioni secondarie, sintomatologia e fascia di età interessata.

Risultati

Dall'inizio di ottobre 2006 al 31 gennaio 2008 sono stati esaminati 229 suini provenienti da 64 aziende del nord e centro Italia. In tabella 1 sono riportati i dati della casistica esaminata ed i risultati ottenuti.
La diagnosi è stata conclusiva per PMWS in 48 aziende. In questi casi le lesioni ai tessuti linfoidi erano caratterizzate da vario grado di deplezione cellulare rappresentata, in ordine di frequenza decrescente, da ipotrofia-atrofia fino alla scomparsa dei follicoli e da rarefazione linfocitaria del tessuto linfoide interfollicolare. Era inoltre rilevabile, non costantemente, la presenza di cellule epitelioidi o giganti centrofollicolari o nei

seni linfonodali peritrabecolari; raramente era evidente una chiara flogosi granulomatosa. Rara la presenza nei macrofagi dei caratteristici corpi inclusi citoplasmatici, anfofilici, di 2-15 micron di diametro, singoli o più spesso riuniti a grappolo. L'indagine immunoistochimica ha messo in evidenza antigeni di PCV2 sia nel citoplasma sia nel nucleo di cellule dendritiche follicolari, mentre solo citoplasmatica in cellule istiocitarie del tessuto interfollicolare e simil-midollare ed incostantemente nelle cellule epitelioidi e giganti centrofollicolari, sinusali o dei granulomi.

Tab. 1. Risultati dell'attività diagnostica per PMWS. *Nella casistica esaminata vengono presentate le 2 condizioni estreme di nessun (0%) o 1 su 4 (25%) campioni positivi, rispettivamente per polmone e tessuto linfoide, e tutti i campioni positivi in tutti i soggetti del gruppo (100%).
Tab. 1. *Results of PMWS diagnosis. *Among the samples tested for each farm, two extreme solutions are presented: none (0%) or 1 of 4 (25%) positive subjects respectively for lung and lymphoid tissue, and all samples of the positive group (100%).*

Variabile	Risultato
Composizione numerica dei gruppi esaminati	Media 3,57 (range 2-7)
Territorialità delle aziende esaminate:	
1. IZS Lombardia – Emilia Romagna	
- Brescia	6
- Mantova	16
- Lodi	15
- Reggio Emilia	10
- Parma	3
- Forlì	2
2. Perugia (veterinari liberi professionisti)	6
3. Bologna (Università – Facoltà di Medicina Veterinaria)	6
Diagnosi di:	
- PMWS	48 allevamenti
- infezione da PCV2	3 allevamenti
- PMWS/PCV2 negativi	13 allevamenti
Diagnosi di PMWS:	
- per la presenza di CI	9 casi su 48 (18,75%)
- per il completamento del percorso diagnostico (istologia + immunoistochimica)	39 casi su 48 (81,25%)
Con diagnosi conclusiva di PMWS:	
- presenza di tipiche lesioni agli organi linfoidi con colocalizzazione del PCV2	
o sul gruppo	100%
o sul singolo soggetto*	25-100%
Con diagnosi conclusiva di PMWS:	
- presenza di tipiche lesioni al polmone con colocalizzazione del PCV2	
o sul gruppo	79%
o sul singolo soggetto*	0-100%
Diagnosi di PMWS	
- in tutti i soggetti del gruppo	21 su 48 (43,75%)
non in tutti i soggetti del gruppo	27 su 48 (56,25%)

Nel polmone, limitatamente ai casi con diagnosi conclusiva di PMWS, era presente una flogosi mista, sia interstiziale che essudativa, nei campioni di 31 allevamenti e solo interstiziale nei campioni provenienti da 17 allevamenti. La polmonite interstizia-

le mostrava estensione variabile, da focale, a multifocale confluente, a diffusa ed era caratterizzata dall'accumulo prevalentemente alveolo-settale, ma anche peribroncovascolare, di macrofagi e linfociti. Rara l'iperplasia degli pneumociti di II tipo (epitelizzazione alveolare). In 19 casi la lesione polmonare aveva una configurazione istologica di polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP), caratterizzata da intensa iperplasia degli pneumociti alveolari e necrosi dell'essudato (macrofagi) presenti sia nell'infiltrato alveolo-settale che nei lumi alveolari. La componente essudativa della flogosi polmonare era riconducibile ad una broncopolmonite o, più raramente, era presente anche una componente alveolare fibrinosa. L'indagine immunoistochimica ha messo in evidenza positività per PCV2 nei campioni di polmone provenienti da 38 allevamenti dei 48 con diagnosi di PMWS (79%). La positività era rilevabile nei campi di polmonite interstiziale in cui erano presenti macrofagi con colorazione marrone del citoplasma sia nell'infiltrato alveolo-settale che negli alveoli. Macrofagi e linfociti positivi per PCV2 erano anche presenti nell'infiltrato peribroncovascolare.
In 21 aziende su 48 (43,75%) la diagnosi di PMWS era dimostrabile in tutti i soggetti del gruppo, mentre nelle rimanenti 27 (56,25%) solo una parte dei soggetti presentava lesioni istologiche e presenza del virus tali da potere confermare la diagnosi. Questo dato conferma la validità del percorso diagnostico esclusivamente come supporto alla diagnosi di allevamento. In figura 2, viene riportata la probabilità di rilevare almeno 1 soggetto con PMWS in funzione dell'intensità di campionamento (da un minimo di 1 fino a un massimo di 10 animali estratti casualmente da una popolazione di 100 soggetti), e per valori crescenti di prevalenza (da un minimo del 20% a un massimo del 40%, come riferito in letteratura), e per valori teorici di sensibilità e specificità del metodo impiegato pari al 100%. E' evidente che la probabilità di rilevare almeno un capo positivo aumenta in maniera proporzionale alla prevalenza della malattia e al numero di soggetti esaminati. Con prevalenza attesa del 30%, il miglior compromesso tra probabilità di rilevare la malattia e costi per la diagnosi consiste nell'esame di 3-5 animali (probabilità: 66,1-83,9%). La maggiore frequenza, nei nostri dati, di gruppi con diagnosi conclusiva solo su alcuni soggetti del gruppo richiede, a nostro avviso, una particolare attenzione nei confronti del campionamento dei soggetti che verranno sottoposti a percorso diagnostico. In ogni caso occorre considerare che l'obiettivo di questa procedura è giungere a una diagnosi di allevamento. In figura 3 sono riportate le probabilità di identificare almeno un soggetto con diagnosi di PMWS confrontando 2 tipologie di campionamento (gruppi di 3 o 5 soggetti) e diverse combinazioni di risultati ottenuti (1 positivo su 3 o su 5, 2 positivi su 3 o su 5, ecc.). A conferma di quanto espresso in precedenza, si evince che solo nei gruppi composti interamente da soggetti con diagnosi di PMWS (3/3 o 5/5 e quindi verosimilmente provenienti da condizioni di alta prevalenza in allevamento) la probabilità di diagnosi di PMWS non sarebbe cambiata esaminando, anzichè 3 o 5, solo 1, 2 o più animali. Nei gruppi in cui il rapporto positivi/esaminati era inferiore (quindi verosimilmente provenienti da condizioni di prevalenza prossima alla condizione media in Italia) la probabilità di diagnosticare almeno 1 capo PMWS positivo è spesso lontana dal 100% sia con 1 che con 2 capi esaminati.
In tabella 2 sono riassunti i dati desunti dal questionario aziendale. La sintomatologia

più frequentemente riferita è stata quella respiratoria, seguita dal deperimento, dalla patologia intestinale e dal ridotto accrescimento. L'età di comparsa della sintomatologia riferibile a PMWS era, nella maggior parte degli allevamenti esaminati, segnalata tra le 9 e le 12 settimane, con una tendenza alla regressione tra le 17 e le 20 settimane.

Tab. 2. Percentuale di aziende che hanno giudicato i parametri elencati diminuiti (↓), invariati (=) o in aumento (↑) nei 2 periodi di tempo considerati.
Tab 2. *Percentage of farms where the listed parameters proved decreased (↓), unchanged (=) or increased (↑) in the time range.*

Variabili *Parameters*	Ultimo anno (% allevamenti) *Last year (% farms)*			Ultimi 5 anni (% allevamenti) *Last 5 years (% farms)*		
	↓	=	↑	↓	=	↑
Mortalità allo svezzamento *Death at weaning*	13.3	43.3	43.3	15.0	30.0	55.0
Scarti allo svezzamento *Wasting at weaning*	14.8	18.5	66.7	25.0	12.5	62.5
Infezioni secondarie *Secondary infections*	11.1	18.5	70.4	15.0	20.0	65.0
Consumo di antibiotici *Antibiotic use*	3.0	18.2	78.8	0.0	11.1	88.9

Discussione

E' oggi una premessa scontata ribadire che l'approccio diagnostico alla PMWS debba dimostrare una associazione lesione-virus valutata su base istologica (Segalés et al., 2005; Chae, 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005). In Italia però, seppure siano relativamente numerose le segnalazioni della presenza e circolazione di PCV2 (Corradi et al., 2004; Verin et al., 2004; Sala et al., 2000; Marruchella et al., 2001) e sulla diagnosi di PMWS, dimostrata mediante evidenza istologica delle lesioni con colocalizzazione dell'agente eziologico (Marcato et al., 1999; Martelli et al., 2000, Mandrioli et al., 2003; Luppi et al., 2004, Fiorentini et al., 2004), sono stati poco enfatizzati la modalità di campionamento ed il ruolo dell'esame istologico nella diagnosi di PMWS. Dall'esame dei questionari emerge spesso un approccio diagnostico errato nell'anamnesi aziendale (impiego della sierologia o della ricerca del genoma virale mediante PCR): in 1 solo caso la diagnosi era stata ottenuta mediante esame istologico, ma non compariva la dimostrazione della presenza del PCV2.
Dall'esame della territorialità (tabella 2), che non vuole riflettere la frequenza di distribuzione nelle singole aree ma solo la presenza, la PMWS si può considerare diffusa sia nel nord che nel centro Italia. L'approccio diagnostico non è stato condotto scegliendo casualmente le aziende, ma individuandole tra quelle con un'anamnesi aziendale indicativa della possibile presenza di PMWS (aumento della percentuale di scarti nel post-svezzamento, sintomatologia mista prevalentemente respiratoria, ma talvolta anche enterica, e scarsa risposta alla medicazione). La presenza di tale condizione anamnestica è risultata spesso associata a PMWS: 48 aziende su 64. In 3 aziende invece, l'assenza di lesioni istologiche associate a positività immunoistochimica per PCV2 ha per-

messo di concludere l'esistenza di una infezione da PCV2. Poiché il virus è noto circolare ampiamente nelle popolazioni suine, è facile in alcuni soggetti potere dimostrare l'infezione (presenza del virus) con metodica immunoistochimica, ma non si vuole assolutamente sostenere la necessità di questo esame per dimostrarla, in quanto, più sensibili sono l'esame sierologico o la PCR che, invece, non potendo dimostrare la presenza delle lesioni non hanno un ruolo fattivo nella diagnosi della malattia (PMWS).

Dai dati ottenuti risulta indispensabile la dimostrazione della presenza del virus mediante opportuna metodica, esame immunoistochimico o ibridazione *in situ* (Segalés et al., 2005; Chae, 2004; Ghebremariam e Gruys, 2005), poiché la possibilità di evidenziare i corpi inclusi virali è un'evenienza poco frequente (9 su 48 diagnosi conclusive di PMWS, 18,75%). Pertanto il percorso diagnostico non dovrebbe mai considerarsi conclusivo con il solo esame istologico mediante colorazione con ematossilina-eosina. Le lesioni in corso di PMWS vengono considerate peculiari, ciò può essere vero per il tessuto linfoide ma non per il polmone in cui PRRSV può essere responsabile di quadri sovrapponibili. Nel tessuto linfoide, però, quadri di deplezione cellulare lieve, come spesso sono occorsi nella casistica esaminata, hanno scarso valore diagnostico se non abbinati alla presenza del PCV2. E' quindi indispensabile, se non si ha evidenza dei corpi inclusi, il ricorso alle sopraccitate indagini per evidenziare il virus, sia nelle lesioni dei tessuti linfoidi che polmonari.

Confrontanto il tessuto linfoide ed il polmone circa la capacità diagnostica, sono state confermate, anche alla luce di questa più ampia casistica, le considerazioni già riferite (Sarli et al., 2007): il tessuto linfoide fornisce le maggiori indicazioni diagnostiche poiché, nel caso di presenza delle lesioni, nel 100% dei casi (visti come diagnosi sul gruppo) esso ha rivelato la positività immunoistichimica per il PCV2, mentre nel polmone, a fronte della presenza della polmonite interstiziale nel 100% dei casi con diagnosi conclusiva di PMWS, solo il 79% hanno dimostrato positività all'indagine immunoistochimica. Pertanto l'intero set di organi impiegato (più stazioni di tessuto linfoide rappresentate da tonsilla, ileo, linfonodi inguinale superficiale e tracheobronchiale ed il polmone) deve essere campionato e non si dovrebbe limitare, per la diagnosi di PMWS, il campionamento al solo polmone, anche nel caso di episodi con sintomatologia clinica prevalente solo di tipo respiratorio.

In più del 50% delle aziende con diagnosi conclusiva di PMWS, il percorso diagnostico ha messo in evidenza la malattia solo in alcuni soggetti del gruppo esaminato. Dati recenti (Alborali e Morvan, 2006) stimano una prevalenza attuale della malattia tra il 5 ed il 20%,in calo rispetto al passato, quando, con decorso acuto, era stimata tra il 20 ed il 40%. Viene però confermato l'attuale carattere endemico della malattia negli allevamenti italiani. Considerando la probabilità teorica di avere almeno 1 soggetto con diagnosi di PMWS (figura 2) in funzione della prevalenza aziendale e dell'intensità di campionamento e la probabilità calcolata sui dati da noi ottenuti (figura 3), è evidente che il metodo diagnostico impiegato appare più potente quando applicato su un gruppo di animali piuttosto che sul singolo soggetto. A supporto di questa considerazione deve anche essere riferito il risultato della probabilità di evidenziare il PCV2 nel contesto delle lesioni istologiche che, seppure maggiori per il tessuto linfoide rispetto al polmo-

ne, per entrambi i tipi di tessuto è ridotta se valutata sul singolo soggetto rispetto alla stessa analisi vista sul gruppo (tabella 1).

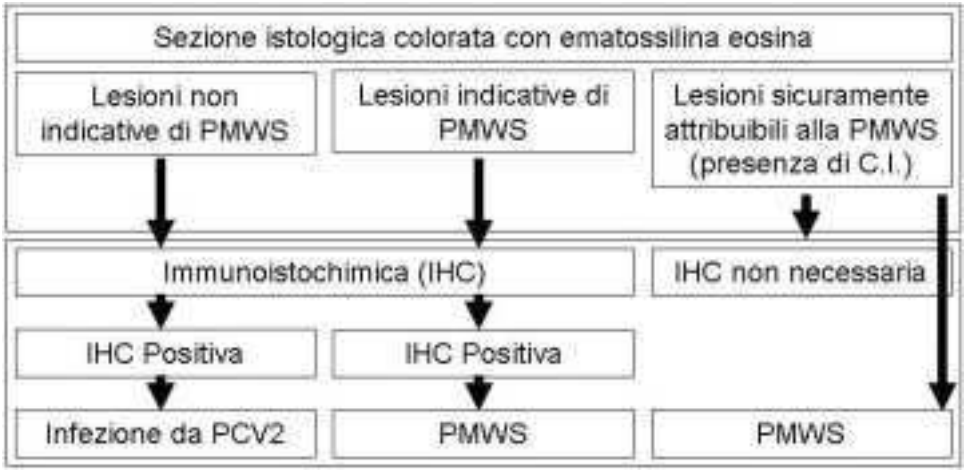


Fig. 1. L'esame istologico e l'interpretazione diagnostica sono stati condotti seguendo le tappe di seguito elencate.
Osservazione delle sezioni colorate con ematossilina-eosina per l'individuazione delle lesioni tipiche della PMWS nei tessuti linfoidi (deplezione cellulare, da cellule epitelioidi singole a microgranulomi epitelioidi spesso centrofollicolari) e nel polmone (polmonite interstiziale) con l'obiettivo di definire una delle seguenti parziali conclusioni diagnostiche: a) lesioni non indicative di PMWS; b) lesioni indicative di PMWS; c) lesioni sicuramente attribuibili a PMWS (solo nei casi in cui alle lesioni fosse associata la presenza dei caratteristici corpi inclusi (CI) citoplasmatici da PCV2).
Osservazione delle sezioni colorate con metodica immunoistochimica per PCV2 per definire la presenza e la distribuzione delle cellule positive.
Conclusione diagnostica:
conferma definitiva di PMWS in casi in cui la presenza di positività all'indagine immunoistochimica era contestuale alla presenza di lesioni indicative di PMWS nel tessuto linfoide e/o nel polmone;
lesioni non attribuibili a PMWS ma: i) infezione da PCV2 nel caso in cui cellule positive al PCV2 erano reperibili in assenza di lesioni indicative di PMWS; ii) lesioni da verificare per l'eziologia in base a risultati degli esami virologici e batteriologici prodotti dalle sezioni diagnostiche IZS.
Fig.1. *Diagnostic interpretation has been performed as follows:*
observation of the H-E stained sections for the recognition of the typical PMWS lesions in the lymphoid (cell depletion, follicle centered epitelioid granulomas) and in the lung (interstitial pneumonia) tissues to acquire the following partial diagnostic conclusions: a) non- PMWS indicative lesions; b) PMWS indicative lesions; c) lesions surely attributable to PMWS (only in the case of characteristic PCV2 cytoplasmic inclusion bodies (IB)).
Observation of PCV2 IHC-stained sections, mainly aimed to the distribution of positive cells than to their amounts.
Diagnostic conclusion:
confirmation of PMWS in those cases where the presence of a positive IHC stain was contextual to the presence of lesions indicative of PMWS in the lymphoid and/or lung tissues;
lesions not attributable to PMWS but: i) PCV2 infection in the cases where PCV2 positive cells were present in absence of lesions indicative of PMWS; ii) non-PMWS cases and absence of PCV2 infection, in those cases lacking lesions of PMWS and resulted negative to IHC.

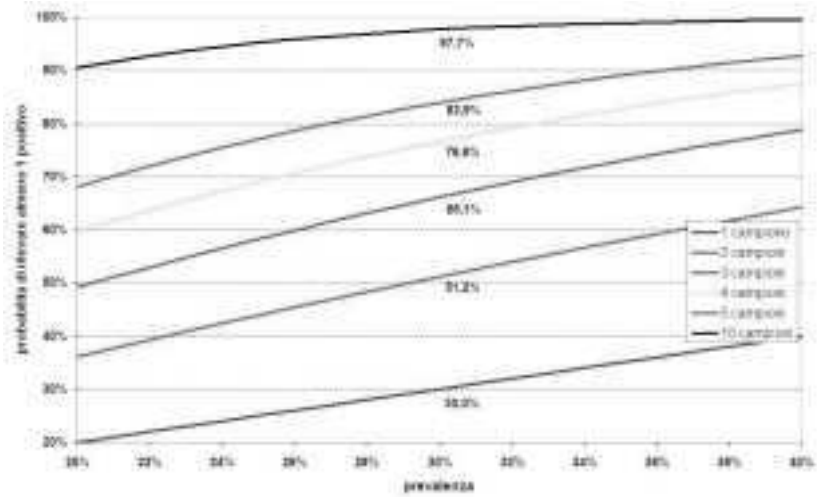


Fig. 2. Probabilità di rilevare almeno 1 soggetto positivo in funzione del numero di soggetti (campioni) esaminati e della prevalenza di PMWS.
Fig. 2.*The probability of detecting at least 1 positive subject according to the numerosity of subjects for samples and the prevalence of PMWS.*

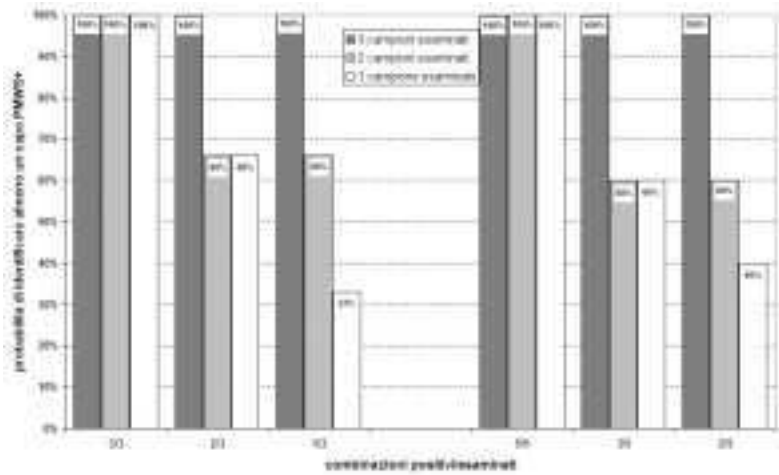


Fig. 3. Probabilità (calcolata dai dati raccolti) di diagnosticare la PMWS in 1 solo suino in gruppi di 3 o 5 soggetti e con diverse combinazioni di positivi per PMWS sul totale del gruppo.
Fig. 3. *Probability (calculated from data collected) to diagnose PMWS in only 1 pig in groups of 3 or 5 subjects with different combinations of positive PMWS cases on the total numerosity of the group.*

Conclusioni

In considerazione del fatto che la prevalenza di PMWS negli allevamenti italiani si è verosimilmente abbassata nel corso degli anni, il migliore compromesso tra la probabi-

lità di diagnosi e i costi degli esami, si ottiene esaminando un gruppo di 3-5 animali mediante il ricorso all'esame istologico con dimostrazione della presenza del PCV2 nelle tipiche lesioni della malattia; ciò in un insieme di organi bersaglio che dovrebbero comprendere più stazioni di tessuto linfoide ed il polmone.

Bibliografia

Alborali L., Morvan H. (2006) "PMWS: evoluzione in Italia e Francia e proposta di un protocollo diagnostico". Atti XXX Corso in Patologia Suina e Tecnica dell'Allevamento, 71-92.

Chae C. (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. The Veterinary Journal, 168, 41-49.

Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. The Veterinary Journal, 169, 326-336.

Corradi A., Dottori M., Gaidella L., Rosignoli C., Cantoni A. M., Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E. (2004) Infezione da porcine circovirus tipo 2 (PCV-2) e aborto. Atti SIPAS, XXX, 215-221.

Fiorentini L., Poggiali M., Tosi G., Paganelli F., Massi P. (2004) Descrizione di un caso di sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento (PMWS) associato all'isolamento di *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* in un allevamento suino del Nord Italia. Atti SIPAS, XXX, 407-412.

Ghebremariam M.K e Gruys E. (2005) Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review. Veterinary Quarterly, 27, 105-116.

Harding J.C.S. (2004) The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Veterinary microbiology, 98, 131-135.

Luppi A., Merialdi G., Bonialuri P., Dottori M., Cantoni A,M., Cabassi E., Corradi A. (2004) Grading cito-istologico delle lesioni linfonodali in corso di PMWS de suino. Atti SIPAS, XXX, 477-485.

Mandrioli L., Sarli G., Ostanello F., Sidoli L., Caprioli A., Preda P., Segales J., Marcato P.S.: Nefrite interstiziale associata all'infezione da PCV-2 del suino. Atti SIPAS, XXIX, 297-302.

Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999) Indagini clinico patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning multisystemic wasting syndrome) in suini del nord Italia. Large Animals Review, 5(2), 47-62.

Martelli P., Terreni M., Borghetti P., Amenna N., Morvan H., Cavirani S. (2000) Aspetti clinici e diagnostici in corso di un focolaio di sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). Atti SIPAS, XXVI, 255-269.

Marruchella G., Cossettini C., Cabassi E., Corradi A., Di Lecce R., Pinoni C., Candotti P. (2001): La sindrome dermatite nefrite del suino (PDNS): rilievi clinici, anatomo-istopatologici e virologici in un allevamento del Nord-Italia. Atti SIPAS XXVII, 169-178.

Sala G., Rigola S., Alborali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000) Development of monoclonal antibodies based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. Proceeding of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 253-254.

Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Sala. V., Leotti G. (2007) "Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS". Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. XXXIII Meeting Annuale 189-202.

Segales J., Allan G.M., Domingo M. (2005) Porcine circovirus diseases. Animal Health Research Review 6, 119-142.

Verin R., Tursi M., Guarda F., Lorenzi D., Millanta F., Poli A. (2004) Lesioni glomerulari associate alla presenza di circovirus tipo II in suini regolarmente macellati nel Nord Italia. Atti SIPAS, XXX, 465-470.

PRESENZA DI PMWS IN ALLEVAMENTI DEL VENETO E FRIULI VENEZIA GIULIA: RISULTATI PRELIMINARI

PMWS IN VENETO AND FRIULI VENEZIA GIULIA SWINE HERDS: PRELIMINARY RESULTS

ELIANA SCHIAVON[1], DENIS VIO[2], FABIO RAMPIN[1], GIORGIO LEOTTI[3], MARTA VASCELLARI[1], FRANCO MUTINELLI[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Pordenone, [3] Merial Italia

Parole chiave: PMWS, PCV2, suino, diagnosi, coinfezione PCV2
Key words: PMWS, PCV2, pig, diagnosis, PCV2 co-infection

Riassunto. Il circovirus di tipo 2 è considerato l'agente eziologico della sindrome multisistemica del deperimento post svezzamento (PMWS). La PMWS colpisce principalmente i suinetti nel tardo svezzamento fino all'inizio dell'ingrasso ed i segni clinici caratteristici sono il deperimento e la linfadenopatia. La diagnosi è confermata dall'esame istopatologico dei tessuti linfatici e dal rilievo immunoistochimico del PCV2 nei tessuti sede di lesione. In questa indagine sono stati esaminati 77 suini con segni clinici di PMWS, provenienti da 16 allevamenti, per valutare la frequenza di infezione da PCV2 e la presenza di coinfezioni nei suini con o senza segni clinici di PMWS. La PMWS è stata rilevata in 7 allevamenti. Una concomitanza di infezione da PCV2 e PRRS era presente in più del 90% dei suini con segni clinici di PMWS.

Summary. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is considered the cause of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). PMWS mainly affects late nursery and early fattening pigs; wasting and lymphadenopathy are considered the most representative clinical sign in this disease. Diagnosis of this infection is confirmed by histopathological examination of lymphoid tissues and detection of PCV2 in affected tissues. In the present survey, 73 pigs with clinical signs of PMWS from 15 different pig herds were examined to get more insights into the frequencies of porcine circovirus 2 infections and the presence of co-infections in pigs with and without clinical signs of PMWS. PMWS was detected in 7 farms. A concurrent infection of PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was found in more than 90% of the pigs with clinical signs of PMWS.

Introduzione

Nell'ambito delle patologie da Circovirus del suino (PCVD), la sindrome multisistemica del deperimento post svezzamento (PMWS) è tra le patologie che creano i maggiori danni economici. Sostenuta da un virus a DNA di forma circolare e di dimensioni mol-

to piccole, la PMWS è stata segnalata per la prima volta in Canada nel 1996 (Harding et al.,1997) e si è poi diffusa nel continente asiatico, nord e sud americano ed europeo. Anche in Italia molte sono le segnalazioni relative alla presenza e alla circolazione del virus PCV2, e ai numerosi focolai di PMWS negli allevamenti della Pianura Padana. Questa patologia colpisce gruppi di animali in età post svezzamento tra le 4 e le 24 settimane di età (Segalés et al., 2004) ed in particolare tra le 8 e 12 settimane. I sintomi più comuni sono: deperimento, problemi respiratori linfadenomegalia, ittero, pallore associato ad anemia, diarrea e scarsa risposta agli interventi terapeutici. All'esame anatomopatologico si rileva costantemente grave linfadenopatia generalizzata, polmoni non collassati con presenza di polmonite interstiziale e, in alcuni casi, consolidamento delle porzioni cranio-ventrali del polmone. Lesioni si possono evidenziare anche a carico del rene (focolai biancastri di diametro variabile) e dell'intestino, ulcere gastriche nella *pars esofagea* dello stomaco ed ittero (Segalés et al., 2004). Le principali lesioni istologiche sono: deplezione linfocitaria con scomparsa dei follicoli e presenza di cellule giganti multinucleate negli organi linfatici, presenza di corpi inclusi intracitoplasmatici ed infiltrazione di essudato infiammatorio linfoistiocitario in numerosi tessuti. La diagnosi si basa su tre importanti criteri i quali devono essere soddisfatti contemporaneamente: presenza di segni clinici compatibili con PMWS, presenza di caratteristiche lesioni microscopiche negli organi d'elezione, presenza di PCV2 (antigene e/o acido nucleico) nella lesione istopatologica. E' quindi fondamentale la conferma della presenza del virus nelle lesioni istologiche tramite immunoistochimica (IHC) o ibridazione *in situ* (ISH) ed eventualmente anche immunofluorescenza indiretta (IIF). L'importanza di una corretta diagnosi di PMWS è alla base di qualsiasi intervento profilattico che si voglia attuare in allevamento. Con questo lavoro si vuole contribuire alla conoscenza della diffusione di PMWS negli allevamenti del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

Materiale e metodi

Da novembre 2007 a gennaio 2008 sono pervenuti, ai laboratori diagnostici di Padova, Pordenone e Verona, 77 soggetti provenienti da 16 allevamenti con sospetto di PMWS. Gli animali sottoposti ad esame provenivano da allevamenti a ciclo aperto o semi aperto di medie dimensioni del Triveneto ed in particolare dalle province di Padova (9 soggetti), Vicenza (5), Udine (22), Verona (4), Venezia (9), Treviso (24), Pordenone (4). Tutti i soggetti morti o soppressi in allevamento sono stati sottoposti ad esame necroscopico e successivo prelievo di organi target per la diagnosi di PMWS quali: tonsilla, ileo, linfonodo tracheobronchiale, linfonodo inguinale superficiale e polmone (Sarli et al., 2007). Altre porzioni d'organo sono state prelevate per eseguire l'esame virologico e batteriologico. In alcuni casi (7 soggetti) sono pervenuti esclusivamente campioni di organo che sono stati successivamente sottoposti al medesimo protocollo.
I campioni destinati all'esame istologico sono stati fissati in formalina tamponata 10%, inclusi in paraffina e le sezioni colorate con ematossilina-eosina; per le indagini immunoistochimiche è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti PCV2 (Ingenasa, M.11.PCV.I36A9).

Tutti i casi sono stati sottoposti ad indagini batteriologiche e virologiche, effettuate tramite PCR-qualitativa, per PRRSv (Persia et al., 2007) e per il virus dell'influenza, in base alle indicazioni raccolte dall'esame necroscopico.
Un soggetto veniva considerato positivo per PMWS quando venivano riferiti segni clinici compatibili con PMWS e vi era contemporanea presenza di lesioni microscopiche caratteristiche negli organi d'elezione e di PCV2 (antigene e/o acido nucleico) in corrispondenza della lesione istologica.

Risultati

Delle 16 aziende controllate, 7 sono risultate positive alla PMWS per un totale di 26 soggetti. Le lesioni anatomopatologiche più frequentemente riscontrate nei suini affetti da PMWS sono state: deperimento, linfadenopatia generalizzata (Fig. 1), pleuropolmonite e pericardite fibrinosa ed enterite. Nei soggetti nei quali non è stata confermata la presenza del virus PCV2 oltre alle lesioni macroscopiche sopracitate si sono osservate anche polmonite catarrale purulenta e polisierosite (Tab. 1).

Fig. 1. Il linfonodo tracheobronchiale si presenta iperplastico e edematoso
Fig. 1. *Tracheobronchial lymphnode. Hyperplastic lymphadenitis and oedema.*

Tab. 1. Frequenza delle lesioni macroscopiche osservate nei 26 soggetti con PMWS e nei 51 con sospetto non confermato di PMWS.
Tab. 1. *Frequency of gross lesions observed in pigs with and without PMWS.*

Lesioni anatomopatologiche	Suini con PMWS	Suini PMWS negativi
Deperimento	15 (58%)	44 (86%)
Polmonite interstiziale	2 (8%)	3 (6%)
Broncopolmonite catarrale purulento	2 (8%)	21 (41%)
Pleuropolmonite/pericardite fibrinosa	12 (46%)	18 (35%)
Linfadenopatia	13 (50%)	24 (47%)
Ulcera gastrica	2 (8%)	2 (4%)
Polisierosite	4 (15%)	13 (26%)
Enterite	12 (46%)	12 (24%)
Nefrite	0 (0%)	1 (2%)
Dermatite	0 (0%)	1 (12%)

Le lesioni istologiche più frequentemente riscontrate sia nei soggetti affetti da PMWS sia in quelli non affetti da PMWS sono state istiocitosi linfonodale e broncopolmonite catarrale purulenta. La deplezione linfocitaria è stata rilevata più frequentemente nei soggetti affetti da PMWS sia a carico dei linfonodi sia delle placche del Pejer e delle tonsille (Tab. 2).

Tab. 2. Frequenza delle lesioni microscopiche osservate nei 26 soggetti con PMWS e nei 51 con sospetto non confermato di PMWS.
Tab. 2. *Frequency of microscopic lesions observed in pigs with and without PMWS*

Lesioni istopatologiche	Suini con PMWS	Suini PMWS negativi
Tessuto linfoide		
Assenti lesioni specifiche	1 (4%)	12 (24%)
Deplezione linfocitaria	8 (31%)	1 (2%)
Istiocitosi	22 (85%)	23 (45%)
Corpi inclusi intracitoplasmatici	0 (0%)	0 (0%)
Cellule giganti multinucleate	2 (8%)	0 (0%)
Necrosi coagulativa multifocale	2 (8%)	2 (4%)
Polmone		
Polmonite interstiziale	5 (19%)	9 (18%)
Broncopolmonite catarrale purulenta	10 (38%)	20 (39%)
Polmonite necrotizzante	0 (0%)	0 (0%)
Ileo		
Enterite erosiva	3 (12%)	10 (20%)
Enterite purulenta	5 (19%)	3 (6%)
Enterite necrotica	3 (12%)	16 (31%)
Deplezione linfocitaria	1 (4%)	0 (0%)
Istiocitosi	7 (27%)	10 (20%)
Tonsille		
Assenti lesioni specifiche	7 (27%)	24 (47%)
Focolai purulento necrotici	6 (23%)	22 (43%)
Deplezione linfocitaria	8 (31%)	0 (0%)

Sono stati sottoposti ad esame immunoistochimico polmone, linfonodo tracheobronchiale, linfonodo inguinale superficiale, ileo e tonsille di tutti i soggetti pervenuti. Nei 26 soggetti positivi la presenza dell'antigene virale è stata rilevata nella totalità dei linfonodi tracheobronchiali (Fig. 2), mentre nel polmone PCV2 è stato riscontrato con una frequenza di circa il 77% (Tab. 3).

Tab. 3. Presenza e frequenza di antigene virale rilevato con IHC in differenti tessuti da 26 soggetti con PMWS.
Tab. 3. *Distribution and frequency of detection of PCV2 antigen in different tissues from 26 PMWS affected pigs.*

Tessuto	PMWS	%
Polmone	20/26	76.9
Linfonodo tracheobronchiale	26/26	100
Linfonodo inguinale superficiale	25/26	96.1
Ileo	25/26	96.1
Tonsille	24/26	92.3

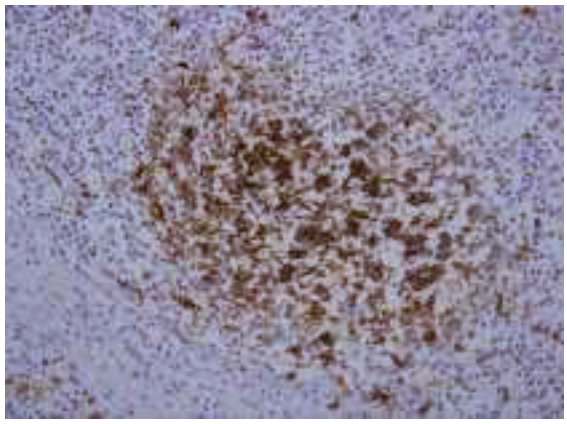


Fig. 2. Linfonodo tracheobronchiale. Positività nei confronti di PCV2 alla prova immunoistochimica. Ingrandimento 20x.
Fig. 2. *Tracheobronchial lymphnode. Positive reaction to PCV2 on immunohistochemistry. Magnification 20x.*

La coinfezione PCV2 con il virus della PRRS è risultata la più frequente in tutti gli allevamenti testati come illustrato in Tab. 4.

Tab. 4. Coinfezioni presenti nei 16 allevamenti testati, sia allevamenti PMWS positivi sia allevamenti con sospetto non confermato di PMWS.
Tab. 4. *Presence of co-infections in swine herds with and without PMWS*

Coinfezioni	Allevamenti PMW -POS	Allevamenti PMWS -NEG
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS)	5/6*	8/9
M. hyopneumoniae	1/6*	0
Swine influenza virus (SIV)	0	0
PRRS e *M. hyopneumoniae*	1/6*	5/9
PRRS e SIV	1/6*	0
PRRS e *M. hyopneumoniae* e SIV	0	0
PRRS e *Haemophilus parasuis*	1/5*	4/9
PRRS e *S. suis*	4/5*	3/9
PRRS e *P.multocida*	1/5*	0
PRRS e *S. suis* e *P. multocida*	1/5*	3/9
PRRS e *S. tiphimurium*	0	1/9
PRRS e *E. coli* emol. e *P. multocida*	0	1/9
Totale allevamenti	7	9

* Presenza di campioni non idonei per l'esecuzione di esami batteriologici e/o virologici.

Discussione

La positività di quasi la metà degli allevamenti sospetti i cui campioni sono pervenuti ai laboratori diagnostici confermano che la PMWS è diffusa anche nel territorio di

nostra competenza, come già ricordato in altri studi (Sarli et al., 2007) e confermato dai risultati delle indagini sierologiche che hanno evidenziato il carattere endemico dell'infezione da PCV2 (Sala et al., 2000). E' di fondamentale importanza ricordare come la diagnosi di PMWS, per quanto articolata e complessa, debba rispondere ai tutti i requisiti sopra citati, cioè la presenza di antigene/acido nucleico virale nelle lesioni istologiche in animali con segni clinici riferibili a PMWS. In questo lavoro abbiamo potuto rilevare che solo una bassa percentuale di soggetti provenienti dallo stesso allevamento soddisfaceva tali requisiti. Risulta quindi importante che i soggetti da sottoporre ad indagine nel caso di sospetta PMWS siano sempre almeno da 3 a 5 e che, in caso di esito negativo, è necessario ripetere il campionamento. Si sottolinea quindi che la diagnosi di PMWS è una diagnosi di gruppo (allevamento). Le lesioni anatomopatologiche più frequentemente rilevate sono state il deperimento organico e la linfadenopatia, presenti in tutti i soggetti, mentre le lesioni a carico degli altri organi e soprattutto del polmone non sempre erano indicative di PMWS. Le lesioni polmonari erano riferibili soprattutto a polmoniti batteriche da *Pasteurella multocida* ed *Haemophilus parasuis*, mentre la polmonite interstiziale è stata rilevata in pochi soggetti, tra cui un suino proveniente da un allevamento in cui è stato evidenziato anche il virus dell'influenza. Questo riscontro contrasta con quanto riportato nella letteratura esistente (Opriessnig et al., 2007). L'enterite e la compromissione microscopica della mucosa intestinale e della componente linfatica associata rilevate in quasi la metà dei soggetti con PMWS potrebbero, considerato che non sono stati evidenziati patogeni enterici, essere indicativi di localizzazione virale. L'istiocitosi è la lesione istologica linfonodale più frequentemente riscontrata nella nostra casistica, mentre la deplezione linfocitaria del parenchima linfonodale e del tessuto linfatico associato all'intestino si osservano solamente quando vi è contemporanea presenza dell'antigene virale. Alcuni studi riportano come l'istiocitosi sia presente durante le fasi iniziali dell'infezione che coincide con la linfadenopatia, che abbiamo visto essere la manifestazione macroscopica più frequente, mentre la deplezione linfocitaria apparirebbe solamente nelle fasi croniche della patologia (Segalés et al., 2004). Nel nostro studio la presenza dell'antigene virale è stata dimostrata nella totalità dei linfonodi tracheobronchiali dei soggetti affetti da PMWS. Come è noto infatti, questo virus ha un tropismo particolare per il tessuto linfatico, mentre nel polmone la presenza dell'antigene virale è stata rilevata nel 75% dei casi. Questi dati confermano quanto riscontrato da Sarli et al. (2007), ma non concordano con altri che evidenziano come tonsille e linfonodi meseraici ed inguinali siano gli organi in cui si riscontra maggiormente la presenza di antigene e/o acido nucleico virale (Segalés et al., 2004). Dai risultati di questa indagine è emersa un'alta frequenza (circa 95%) di co-infezione con il virus della PRRS come evidenziato in altri stati (Wellenberg et al., 2004) e di infezioni batteriche di eruzione secondaria. L'elevata positività a PRRSv deve essere in ogni caso interpretata alla luce delle metodologie diagnostiche utilizzate per la ricerca virale. Infatti, la PCR-qualitativa utilizzata è un metodo molto sensibile. Questo riscontro confermerebbe la necessità di un controllo della viremia da PRRS nei soggetti affetti da PMWS (Sarli et al., 2007), come di altre possibili infezioni virali.

Conclusioni

Grazie alla possibilità di applicare un corretto protocollo diagnostico (Sarli et al., 2007) si è potuto evidenziare e quantificare la presenza di PMWS nel territorio di nostra competenza, nonché confermare un'alta positività per PRRSv di cui è utile tenere conto nella valutazione e applicazione di efficaci protocolli di profilassi indiretta e diretta delle principali infezioni virali presenti nei nostri allevamenti.

Bibliografia

Harding J., Clark E. (1997) Recognizing and diagnosing post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health Production 5, 201-203.

Opriessnig T., Meng X.J., Halbur P.G. (2007) Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 19, 591-615.

Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Sala V., Leotti G. (2007) Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS. Atti SIPAS XXXIII, 189-202.

Chae C. (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. Veterinary Journal, 168, 41-49.

Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Veterinary Journal, 169, 326-336.

Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. Veterinary Microbiology 98, 137-149.

Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001) Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples". International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology" Salsomaggiore, Italy, 157-178.

Sala G., Rigola S., Alborali G.L, Brocchi E., Cordioli P. (2000) Development of monoclonal antibodies based ELISAs for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. Proceeding of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 253-254.

Wellenberg G.J., Stockhofe-Zurwieden N., BoersmaW.J., De Jong M.F., Elbers A.R. (2004) The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. Research in Veterinary Science, 77, 177-184.

VACCINAZIONE INTENSIVA NEI CONFRONTI DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) NEL CONTROLLO DI UN FOCOLAIO DI MALATTIA DA PCV2 (PCVD) IN UN ALLEVAMENTO A CICLO APERTO

INTENSIVE VACCINATION STRATEGY AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE2 (PCV2) IN THE CONTROL OF A PCV2 DISEASE (PCVD) OUTBREAK IN A FARROW-TO-WEANING FARM

ALBERTO CASTELLAN[1], LORIS ALBORALI[2], MARIAGRAZIA ZANONI[2]
[1] M.Veterinario LP, Castelfranco Veneto, Italia, [2] IZSLER, Brescia, Italia

Parole chiave: PCV2, CIRCOVAC, suini, vaccinazione
Key words: PCV2, CIRCOVAC, swine, vaccination

Riassunto. In un allevamento italiano a ciclo aperto di 1500 scrofe, dopo l'insorgenza di grave mortalità e deperimento nel settore svezzamento, è stato applicato un percorso diagnostico che ha permesso di identificare la presenza di un focolaio di PCVD (malattie da Circovirus suino tipo 2) complicato. Lo studio riporta ed esamina gli effetti di un programma di controllo del focolaio stesso dopo 6 mesi di applicazione di un piano vaccinale intensivo con CIRCOVAC® (vaccino inattivato contro PCV2). In seguito alla applicazione di tale programma si è osservata una notevole riduzione della mortalità, del numero degli "scarti" e del consumo di antibiotici; lo stato generale di salute e le performance zootecniche sono tornate nella norma ed inoltre non sono stati più evidenziati casi di PDNS.

Abstract. A diagnostic protocol was applied in an Italian farrow-to-weaning farm of 1500 sows after the appearance of severe mortality and wasting in the weaners. A complicated outbreak of PCVD (Circovirus type 2 diseases) was identified. The effects of an intensive vaccination with CIRCOVAC® (inactivated vaccine against PCV2) were studied. The vaccination was able to reduce dramatically mortality, the number of poor doers and the use of antibiotics; PDNS completely disappeared and growth performances returned back to optimal level.

Introduzione

Attualmente la PMWS si manifesta con caratteristiche che sono piuttosto differenti dalla forma clinica descritta a metà degli anni novanta. Oggi i sintomi clinici sono meno evidenti, anche se la mortalità può permanere comunque a livelli elevati. Per determinare l'implicazione di PCV2 nelle PCVD è ora necessario ampliare il campionamento (1, 2) rispetto ai protocolli diagnostici inizialmente proposti da S. Sorden (3).
L'obiettivo di questo lavoro è quello di descrivere come è stato gestito un focolaio acuto di PCVD complicato da co-infezioni, partendo dalla diagnosi fino alla messa a pun-

to di una strategia di vaccinazione che, sulla base dei dati attualmente disponibili, sembra aver contribuito alla soluzione del problema.

Materiali e Metodi

Descrizione dell'allevamento
Lo studio è stato condotto in un allevamento a ciclo aperto di 1500 scrofe che produce suini di 30 kg situato in Veneto. I suinetti sono svezzati a 21 giorni di vita, poi allevati in gabbiette (PS) per 3-4 settimane e infine messi a terra fino a 85-90 giorni di vita. L'allevamento è positivo al virus di Aujeszky(ADv), della PRRS, a *Mycoplasma hyopneumoniae (M.h.)* e *Actinobacillus plueuropneumoniae*, mentre il virus dell'influenza non è mai stato evidenziato.
I programmi vaccinali nel 2006, oltre alle vaccinazioni obbligatorie nei confronti della malattia di Aujeszky, prevedevano: nelle scrofe, interventi vaccinali nei confronti della rinite atrofica, parvovirosi + mal rosso e PRRS; nei suinetti, interventi vaccinali nei confronti della Malattia di Aujeszky e *Mycoplasma hyopneumoniae (M.h.).*

Descrizione del caso-diagnosi
Nella seconda metà del 2006 circa il 50% delle scrofe furono sostituite da scrofette di 6 mesi di vita. ad elevato status sanitario (ADv, PRRSv e *M.h.*-free). A partire da dicembre 2006 - gennaio 2007 i suini dopo lo svezzamento manifestarono una grave sintomatologia con una percentuale di mortalità e "scarti" superiore al 30%. I sintomi clinici erano rappresentati da problemi respiratori, poliartriti, grave deperimento e Sindrome della Dermatite Nefrite Suina (PDNS). Alla necroscopia furono evidenziati linfoadenopatia, polisierosite diffusa e polmonite interstiziale. I test sierologici e virologici (PCR qualitativa) evidenziarono una circolazione precoce del virus della PRRS (tipo europeo), di *Haemophilus parasuis (H.p.)* e anche di altri batteri comunemente riscontrati negli allevamenti italiani. In tabella 1 sono riepilogati i principali eventi. Dal momento che il tentativo di risolvere il problema inizialmente con la vaccinazione nei confronti di *H.p.* e PRRSv (MLV) ed anche con l'uso di nuovi antibiotici non portò a risultati soddisfacenti, sorse il sospetto che ci si trovasse di fronte ad un focolaio di PCVD. Nel mese di maggio 2007 fu inviato al laboratorio un primo campione di 6 animali ammalati per effettuare una necroscopia completa, istopatologia e ricerca di PCV2. Dal momento che la prima diagnosi non fu in grado di evidenziare la presenza di PCV2, fu inviato al laboratorio un secondo gruppo di 16 suini ammalati. Nel giugno 2007 fu emessa una diagnosi positiva di PMWS sia dal laboratorio di diagnostica dell'IZS di Brescia sia dall'Università di Bologna mediante esame autoptico, istopatologia, immunofluorescenza diretta (IF) e immunoistochimica (IHC).

Strategia vaccinale
Fu quindi presa la decisione di effettuare una vaccinazione intensiva con CIRCOVAC, (vaccino inattivato nei confronti di PCV2, Merial) vaccino già registrato con procedura centralizzata a livello europeo, ma non ancora disponibile in Italia. Il veterinario azien-

dale richiese un permesso speciale di importazione del vaccino stesso accolto positivamente dalle autorità sanitarie. Fu applicata una prima vaccinazione a tutti i suinetti di età compresa tra le 3 e le 7 settimane di vita (dose utilizzata per suinetto: 0,5 ml/IM) e poi successivamente a tutti i suinetti che raggiungevano l'età di 3 settimane. A fine agosto fu reintrodotta la vaccinazione nei confronti di PRRSv (MLV-Ceppo europeo), interrotta a maggio 2007, per cercare di contrastare l'elevata circolazione di questo virus evidenziata da numerosi test sierologici e PCR (qualitativa) in scrofe e suinetti.

Fig. 1. Suini con PMWS-Luglio 2007.
Fig. 1. *Pigs with PMWS. July 2007.*

Fig. 2. Suini clinicamente sani-Novembre 2007.
Fig. 2. *Health pigs-November 2007.*

Tab. 1. Eventi, trattamenti e risultati nel 2007
Tab. 1. *Events, treatments and results of the case in 2007*

Mesi	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic
Mortalità Svezzamento (PS)	30%	30%	21%	18%		10-11%		9,9%	1,63%	1,1%	1,88%	1,9%
Diagnosi	PRRSV H.paras. Altri batteri				PMWS		PRRSV in scrofe e suinetti					
vaccinazioni	M.hyo	M.hyo+ H.paras.	M.hyo+ H.paras.	Interrotta M.hyo e H.paras.; PRRS-MLV	PRRS-MLV interrotta	-	CIRCOVAC (17/07/07) 3-7 settimane di vita	CIRCOVAC + PRRS nei suinetti	CIRCOVAC +PRRS	CIRCOVAC +PRRSV	CIRCOVAC +PRRSV	CIRCOVAC +PRRSV
trattamenti	Antibiotici	Antibiotici	Antibiotici	Antibiotici	Antibiotici	Antibiotici	Diminuzione dell'utilizzo degli antibiotici dell'80% vs 6 mesi precedenti					

Risultati e discussione

La mortalità, riportata in tabella 1, a fine agosto, dopo poco più di un mese dalla introduzione delle vaccinazioni contro PCV2, diminuì solo leggermente a causa della elevata mortalità dei suinetti più vecchi non ancora vaccinati. In seguito, la mortalità diminuì drasticamente in settembre 2007 scendendo a 1,63% e rimanendo a livelli similari nei mesi seguenti: 1,1% ad ottobre, 1,88% in novembre e 1,9% in dicembre. Contemporaneamente diminuì la produzione di suini "scarto", migliorò il livello sanitario generale, non furono più segnalati casi di PDNS e le performance di crescita ritornarono gradualmente ai livelli ottimali per questa azienda. Conseguenza di ciò fu anche una drastica riduzione dell'utilizzo di antibiotici tra agosto e dicembre 2007, con una diminuzione dell'80% circa del costo dei trattamenti stessi rispetto alla prima parte dell'anno.

Conclusioni

Questa prima esperienza in Italia di vaccinazione intensiva con CIRCOVAC, utilizzata nell'ambito di un piano di controllo più generale per affrontare un episodio acuto di PCVD, sembra aver fornito un aiuto importante nello sforzo di ripristinare una situazione clinica normale e ristabilire corrette performance produttive anche in situazioni complesse con la presenza di co-infezioni.

Bibliografia

1. Alborali L., Morvan H. (2006) "PMWS: evoluzione in Italia e Francia e proposta di un protocollo diagnostico". Atti XXX Corso in Patologia Suina e Tecnica dell'Allevamento, 71-92.
2. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Sala. V., Leotti G. (2007) "Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS". Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. XXXIII Meeting Annuale 189-202.
3. Sorden S. (2000) "Update on porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome". J.Swine Health and Production 8(3) 133-136.

®CIRCOVAC è un marchio registrato di Merial

VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA SUINA E VIRUS DELLA MALATTIA D'AIUESZKY: VACCINAZIONE INTRADERMICA CON ANTIGENI SEPARATI OD ABBINATI

PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME AND AUJESZKY DISEASE VIRUS: INTRADERMAL VACCINATION WITH COMBINED OR SINGLE ANTIGENS

POZZI P.[1], VEZZOLI F.[2], BLANCHAERT A.[1], FALCO F.[3]
[1]Veterinario, Intervet Italia, Peschiera Borromeo (MI); [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Lodi (LO); [3]Veterinario Libero Professionista, (CN)

Parole chiave: PRRSV, ADV, vaccinazione, intradermica, combinazione, sierologia
Key words: PRRSV, ADV, vaccination, intra-dermal, combination, serology

Riassunto. Nella moderna industria suinicola gli schemi vaccinali stanno diventando progressivamente più intensivi, allo scopo di ottimizzare le performance produttive di riproduttori e soggetti da ingrasso, ma anche più onerosi in termini di manodopera associata alle vaccinazioni. Permangono le preoccupazioni relative ai rischi associati con le somministrazioni parenterali, quali trasmissione di patogeni, reazioni tissutali, rotture di aghi e reazioni comportamentali. Queste ultime diventano importanti nei riproduttori a causa dell'elevato numero di vaccinazioni ricevute. La vaccinazione intradermica e l'utilizzo di combinazioni antigeniche può essere d'aiuto nella riduzione del carico di lavoro, nella trasmissione di patogeni e nel benessere animale. In questa prova sono state verificate innocuità ed efficacia di due antigeni vaccinali, PRRSV ed ADV, quando somministrati per via intradermica in abbinamento o singoli.

Summary. In the modern swine industry, vaccination schemes are becoming progressively more intensive, in order to optimize productive performance in both breeders and fattening animals, but also time-consuming. Concerns remain in respect of the risks associated with parenteral administration such as diseases transmission, tissues reaction, broken needles and behavioural responses, the last of these being of most importance in breeding sows and gilts which usually require several doses during the year. Intradermal, needle-less vaccination and combinations of antigens may help in reducing workloads, disease risks and concerns about animal welfare. In this trial, safety and immunological efficacy of two antigens, PRRSV and ADV, were analyzed when given at the same time, either separately, or in combination, via the intradermal route.

Introduzione

Nella moderna industria suinicola l'ottimizzazione delle produzioni, sia nei riproduttori che nei soggetti da ingrasso, è difficilmente possibile, se non irrealizzabile, senza

l'utilizzo sistematico di prodotti immunizzanti nei confronti delle più comuni patologie. Gli schemi vaccinali progressivamente diventano sempre più intensivi e necessitano di sempre più tempo e manodopera per la loro esecuzione. A fronte del beneficio offerto dalle vaccinazioni intensive e di massa, rimangono comunque le preoccupazioni generalmente associate ai trattamenti parenterali di massa: potenziale trasmissione iatrogena di patogeni, reazioni tissutali con deprezzamento della parte interessata, rotture di aghi. Sta inoltre acquisendo importanza anche l'impatto sul benessere animale, soprattutto su scrofe e scrofette che, di solito, ricevono un elevato numero di trattamenti immunizzanti (4). La vaccinazione intradermica (1) ed un'efficace abbinamento di antigeni (2,3,4) possono essere d'aiuto nella riduzione del carico di lavoro, nei rischi di trasmissione di malattie ed anche relativamente al benessere animale. Lo scopo di questo lavoro è stato di analizzare sicurezza ed efficacia immunologia della somministrazione di due antigeni vaccinali vivi attenuati, rispettivamente Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRSV) e Virus della Malattia d'Aujeszky (ADV), quando somministrati nello stesso momento, sia separatamente che in abbinamento, per via intradermica. Inoltre si è voluto valutare se vi fossero differenze nell'evocazione della risposta immunitaria vaccinando per via ID in due diverse zone del corpo: zona retroauricolare e zona perineale.

Materiali e metodi

La prova è stata condotta in un'Azienda a ciclo chiuso di circa 650 scrofe, situata in Piemonte. L'Azienda si rifornisce di rimonta esterna, che prima dell'introduzione viene tenuta in quarantena per circa due mesi in una stalla isolata. Nella stalla d'isolamento la rimonta, arrivata ad un peso di circa 60-70 kg, è sottoposta ad un piano vaccinale considerato standard per i giovani riproduttori pre-fecondazione, e costituito da vaccinazione e richiamo verso Parvovirus suino (PPV), Mal Rosso (MR), Rinite Atrofica (RA), PRRSV ed ADV.
Gli antigeni utilizzati in questa prova sono stati:
– PRRSV, ceppo Europeo vivo attenuato (Porsilis PRRS), a concentrazione 10^4 $TCID_{50}$ per dose
– ADV, ceppo Begonia gE- tK- vivo attenuato (Porsilis Begonia), a concentrazione $10^{5.5}$ $TCID_{50}$ per dose
Entrambi gli antigeni sono disponibili in forma liofilizzata, con adiuvante acquoso presentato a parte.
L'adiuvante è costituito da d,l α tocoferolo acetato (Vitamina E) e si presta ad un duplice utilizzo: diluizione della singola dose vaccinale per applicazione intramuscolare (IM) in un volume di 2 cc, oppure diluizione della dose vaccinale in un volume di 0,2 cc per l'applicazione intradermica (ID). Per la prova in oggetto è stata utilizzata la vaccinazione per via ID, quindi con diluizione delle dosi di antigene in un volume finale di 0,2 cc.
Per la somministrazione ID è stato utilizzato un vaccinatore senz'ago (IDAL®), elettronicamente controllato, in grado di esercitare una pressione di 2,7 – 3,7 Newton per 2-3 millisecondi (msec) e di mantenerla superiore ad 1 Newton per 15-20 msec, sufficienti a far penetrare un volume di 0,2 cc nello spessore del derma.

I soggetti complessivamente sottoposti alla prova sono rappresentati da 98 scrofette, individualmente identificate con marca auricolare numerata e così suddivise in gruppi:
– A: 26 scrofette, vaccinazione ID nella zona retroauricolare e richiamo a 4 settimane di distanza; antigeni PRRSV ed ADV in abbinamento *
– P: 26 scrofette, vaccinazione ID nella zona perineale e richiamo a 4 settimane di distanza; antigeni PRRSV ed ADV in abbinamento *
– S: 30 scrofette, vaccinazione ID nella zona retroauricolare e richiamo a 4 settimane di distanza; antigeni PRRSV ed ADV somministrati separatamente ma contemporaneamente sui due lati del collo **
– C: 16 scrofette, controllo non vaccinate; non è stato somministrato alcun placebo.
*Nota: * 0,2 cc di adiuvante contenevano entrambi gli antigeni*
*** 0,2 cc di adiuvante per ognuno degli antigeni.*
Tramite immobilizzazione con torcinaso ed utilizzo di vacutainer senza anticoagulante e con ago nuovo per ogni soggetto, sono stati eseguiti prelievi di sangue al momento della prima vaccinazione (T 0), del richiamo dopo 4 settimane (T 1) e 30 giorni dopo il richiamo (T 2), in tutti i soggetti coinvolti nella prova, inclusi i controlli.
Al momento dell'esecuzione del prelievo sono state eseguite anche le vaccinazioni.
I campioni di sangue sono stati sierati, congelati, conservati sino a T 2 e quindi sottoposti a valutazione sierologia presso lo Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia (IZSLER), sezione di Lodi. Sono state valutati i titoli anticorpali evocati dagli antigeni PRRSV ed ADV nei differenti piani vaccinali.
ADV: test sierologico ELISA-competizione verso gli antigeni gE e gB, secondo le metodiche in uso presso IZSLER, sezione di Lodi. I risultati sono espressi come media in $\log_{10}$ del reciproco dell'ultima diluizione.
PRRSV: test sierologico ELISA-competizione IDEXX, secondo le metodiche in uso presso la sezione IZSLER, sezione di Lodi. I risultati sono espressi come media del rapporto s/p.
Alcuni sieri T0, in pool, sono inoltre stati sottoposti a Polimerase Chain Reaction (PCR) per PRRSV, secondo le metodiche in uso presso IZSLER, sezione di Lodi, per confermare lo status di indennità da PRRSV al momento dell'inizio della prova.
Sono state valutate eventuali reazioni di carattere locale o generale nei soggetti coinvolti nella prova.
Sono stati valutati: lo s/p medio PRRSV; il titolo anticorpale medio ELISA ADV-gB; la percentuale di animali che hanno sieroconvertito, per ognuno dei gruppi di vaccinazione.
I risultati ottenuti nei diversi gruppi di vaccinazione sono stati comparati con T-test.
Il test sierologico ADV gE è stato anche utilizzato quale ulteriore monitoraggio per il mantenimento dello status di Aujeszky indenne.

Risultati

Non si sono verificate reazioni indesiderate di tipo generale o locale nei soggetti vaccinati. I risultati relativamente alla percentuale di soggetti che hanno sieroconvertito, sono illustrati in tabella 1.

Tab. 1. Percentuale di sieroconversione, valutata a T2, per ogni gruppo di vaccinazione e per ogni antigene.
Tab. 1. *Percentage of seroconverting animals for each vaccination group and for both antigens at T 2.*

Sieroconversione, T2	A	S	P	C
PRRSV	100%	100%	90,47%	0%
ADV	100%	100%	95,23%	0%

I Grafici 1 e 2 illustrano l'evoluzione dei titoli anticorpali medi per ogni gruppo di vaccinazione in relazione ai due antigeni.

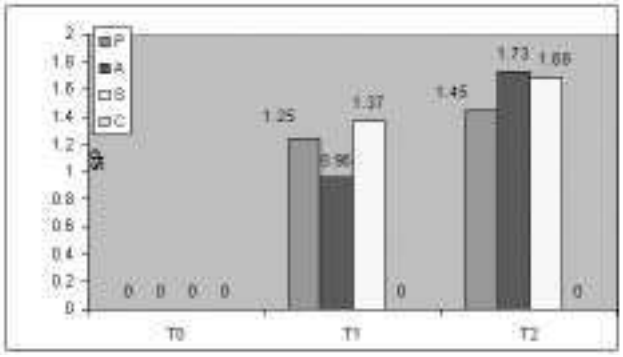


Fig. 1. Evoluzione del valore s/p PRRSV
Fig. 1. *Evolution of s/p ratio for PRRSV.*

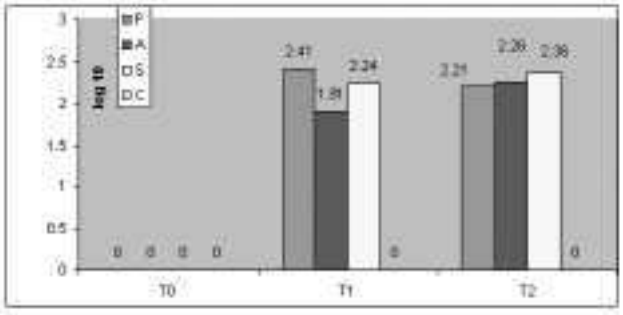


Fig. 2. Evoluzione dei titoli ELISA ADV g-B, espressi in log10 (diluizione 1: 2 pari a 0.3 $\log_{10}$; diluizione 1: 256 pari a 2.4 $\log_{10}$)
Fig. 2. *Evolution of ELISA ADV g-B titers , in* log_{10}

I valori s/p PRRSV ed ELISA ADV g-B, valutati a T 2 sono stati comparati tra di loro relativamente ai diversi gruppi di vaccinazione; Ttest non ha evidenziato differenze statisticamente significative, come illustrato in Tabella 2.

Tab. 2. Comparazione dei valori s/p PRRSV ed ELISA ADV-gB tra tutti i gruppi di vaccinazione.
Tab. 2. *Comparison of s/p PRRSV values and ELISA ADV-gB between all vaccination groups.*

	A	S	P	C
valori s/p PRRSV	1,68	1,73	1,45	0
Ttest (A vs P)	0.78 non signif			
Ttest (S vs P)		0.14 non signif		
Ttest (A vs S)	0.36 non signif			
	A	S	P	C
titoli ELISA ADV g-B	2,26	2,36	2,21	0
Ttest (A vs P)	0.06 non signif			
Ttest (S vs P)		0.14 non signif		
Ttest (A vs S)	0.06 non signif			

Discussione

Non si sono trovate differenze statisticamente significative nelle medie dei valori s/p PRRSV o dei titoli anticorpali ELISA ADV g-B in seguito alle vaccinazioni sia con antigeni singoli che abbinati, sia con vaccinazione ID nel collo che nella zona perineale. Il gruppo P vaccinato in zona perineale ha mostrato una percentuale lievemente minore di sieroconversione, sia per s/p PRRSV che per ELISA ADVg-B (90,47% e 95,23% rispettivamente). Nel gruppo P, comunque, i titoli medi a T2 non differiscono significativamente da quelli dei gruppi A ed S. La minor percentuale di sieroconversione potrebbe quindi essere spiegata con qualche difficoltà di somministrazione, forse dovuta al movimento degli animali o alla zona perineale particolarmente sporca, piuttosto che ad una minore efficacia degli antigeni.

La vaccinazione con antigeni abbinati, anche utilizzando un sito di applicazione inusuale, può portare agli stessi risultati da un punto di vista immunologico, quali quelli ottenuti utilizzando gli stessi antigeni separatamente, ed in un sito di applicazione più usuale quale il collo. La possibilità di vaccinare utilizzando antigeni in abbinamento, la flessibilità del sito di vaccinazione e l'applicazione ID senz'ago, possono tutte essere d'aiuto nella riduzione del carico di lavoro e nello stress per gli animali, senza che tuttavia venga inficiata l'efficacia della vaccinazione.

Bibliografia

Visser N, Egger W, Lutticken D, (1994), "ID application of ADV strain Begonia with tocopherol-based adjuvant and a novel design injection device" Acta Vet. Hung., 42 (2-3), 413-418

Gozio S, Morganti P, Smeets J, (2006), "Safety and efficacy of combined administration of Porsilis PRRS & Porsilis Begonia", 19th IPVS, 2:57

Rosales E, Mendoza S, Martens M, Quintero V, Ramirez C, Luna E, Vargas A, Reynoso M, (2006), "Use of novel ID needle-free system: a field study comparing it with conventional IM injection for administration of ADV vaccination (Porsilis Begonia), 19th IPVS, 2:157

Kristensen C, Andreasen M, Ersboll A, Nielsen J, (2004), "Antibody response in sows and piglets following vaccination against *M hyopneumoniae*, toxigenic *P. multocida* and *A.pleuropneumoniae"*Can. J. Vet. Res. 68 (1):66-70

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI MALATTIA VESCICOLARE SUINA NELLA REGIONE MARCHE, NEL 2007

AN OUTBREAK OF SWINE VESICULAR DISEASE IN MARCHE REGION, DURING 2007

COSTARELLI S.[1], BELARDINELLI C.[2], NOCE G.[3], BIASINI G.[1], ORSINI S., DURANTI A.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; [2]Azienda Sanitaria Unica Regionale, Zona Territoriale 5 Jesi; [3]P.F. Veterinaria e Sicurezza Alimentare Regione Marche

Parole chiave: Malattia Vescicolare Suina, focolaio, Regione Marche
Key words: Swine Vesicular Disease, Outbreak, Marche Region

Riassunto. Nelle Regioni italiane riconosciute indenni dalla Malattia Vescicolare Suina (MVS), il Piano di Sorveglianza prevede controlli sierologici da effettuare una volta all'anno nelle aziende a ciclo chiuso, due volte all'anno negli allevamenti a ciclo aperto. Il campionamento va effettuato su 12 suini da riproduzione prelevati casualmente o su tutti i suini, da riproduzione, presenti nell'azienda se meno di 12. Sulla base di tale Piano la Regione Marche è stata riconosciuta ufficialmente indenne da Malattia Vescicolare Suina dal 2001. In questo lavoro viene riportato l'episodio relativo ad un focolaio di MVS che si è registrato nel territorio marchigiano nel corso del 2007; vengono descritte le modalità operative di intervento e l'esito del focolaio.

Abstract. A Control and Eradication Plan of Swine Vesicular Disease (SVD) is currently applied in Italy. It is based on epidemiological surveillance of pig herds and collecting points as stated by the Act of the Ministry of Health of July 26th 2001. The Plan consists on serological tests (ELISA) for SVD virus antibody detection. Each year 12 samples are collected in the breeding farms or twice a year in all the other farms. In spite of the Eradication Plan, circulation of SVD virus is still observed in some italian Regions, especially in southern of Italy. On the basis of the results of the Eradication Programme the Marche Region is SVD free since 2001. The aim of this work is to report how an outbreak of Swine Vesicular Disease, occurred in Marche Region during 2007, was managed.

INTRODUZIONE

L'Ordinanza Ministeriale 26 Luglio 2001 (1), e successive integrazioni, regola il Piano di Sorveglianza e di Eradicazione della Malattia Vescicolare con l'obiettivo di garantire che tutte le regioni italiane conseguano la qualifica di regioni ufficialmente indenni o la mantengano, qualora tale qualifica sia stata raggiunta.

La maggior parte delle regioni italiane sono state riconosciute indenni a seguito dell'esito favorevole dei campionamenti previsti dalla normativa. Tuttavia in alcune regioni, come la Lombardia, la Campania, la Calabria, la Sicilia, la particolare realtà zootecnica ed il contemporaneo cambiamento del quadro clinico della malattia, ne hanno favorito il persistere costituendo un rischio per le altre regioni a seguito di scambi commerciali (2).
Nella regione Marche le attività di sorveglianza vengono svolte regolarmente e la Regione risulta ufficialmente indenne dal 2001.
Nel presente lavoro si descrive l'episodio di un focolaio di MVS registrato nel Comune di Filottrano, provincia di Ancona, nel corso del 2007. Vengono descritte le attività svolte dall'Unità Sanitaria Locale di Jesi presso l'azienda interessata, le misure applicate, le modalità operative di intervento, l'apertura del focolaio ed il suo esito.

MATERIALI E METODI

In data 22 marzo 2007 la Unità Sanitaria Locale (USL) di Avezzano (AQ) comunicava alla USL di Jesi (AN) che in una stalla di sosta abruzzese (AQ1) era stata rilevata una positività virologica per Malattia Vescicolare Suina; la stessa stalla aveva ricevuto nei giorni precedenti una partita di suini dall'allevamento AN1 di Filottrano (AN). L'azienda AN1 è un'azienda da ingrasso in cui, al momento dell'indagine, erano presenti in un unico capannone 727 magroni, tutti provenienti dalla Danimarca. Il personale veterinario della zona USL di Jesi procedeva al prelievo di 59 campioni di siero dai suini.
Il sangue prelevato veniva sottoposto a test ELISA per MVS (3) presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche e 9 campioni risultavano positivi. La positività veniva confermata dal Centro di Referenza per le Malattie Vescicolari di Brescia (CERVES). La Sieroneutralizzazione rivelava la presenza di anticorpi IgG in tutti i campioni e di anticorpi IgM in 5 di essi; la ricerca del virus effettuata su campioni di feci ne confermava la presenza. Il 2 maggio 2007 l'azienda veniva posta sotto sequestro, il 16 maggio si concludevano le operazioni di abbattimento e distruzione dei suini presenti nell'allevamento infetto.

Attività di contenimento dell'infezione e risanamento
Nell'allevamento infetto, nell'area di protezione e nell'area di sorveglianza sono state portate avanti tutte le attività previste dal Manuale Operativo redatto dal CERVES per il contenimento dell'infezione. Le operazioni di risanamento dell'azienda infetta hanno previsto le seguenti attività:
– Censimento degli animali presenti
– Divieto di spostamento degli animali, dei prodotti di origine animale, di oggetti, utensili, attrezzature
– Controllo dello spostamento delle persone
– Abbattimento e distruzione dei capi presenti
– Pulizia e disinfezione dell'azienda infetta.
Le operazioni di disinfezione del capannone, delle attrezzature, dell'area circostante e dei camion impiegati per il trasporto delle carcasse sono state effettuate utilizzando il

disinfettante Glutaraldeide. I liquami presenti nella vasca adiacente al capannone sono stati risanati mediante utilizzo di idrossido di potassio, secondo quanto stabilito dal Manuale Operativo.
Nella zona di protezione sono state portate avanti le seguenti operazioni:
– censimento e georeferenziazione di tutte le aziende che detengono animali sensibili;
– visite cliniche e monitoraggio sierologico degli allevamenti censiti;
– restrizione delle movimentazioni;
Nella zona di sorveglianza le aziende di suini presenti sono state censite, georeferenziate e sottoposte a visita clinica; sono stati sierologicamente controllati 567 suini destinati alla macellazione e sono risultati tutti negativi.
Le operazioni di contenimento dell'infezione e di risanamento sono state portate avanti dalle USL in collaborazione con il Servizio Veterinario Regionale nel rispetto scrupoloso della normativa vigente e secondo le procedure indicate dal Piano Nazionale di Emergenza redatto dal CERVES. Date le caratteristiche di resistenza nell'ambiente del virus della Malattia Vescicolare, le operazioni di disinfezione degli ambienti di allevamento, degli autocarri per il trasporto degli animali abbattuti e della vasca dei liquami sono state effettuate con particolare cura utilizzando i disinfettanti indicati dalle procedure.
Il controllo degli allevamenti presenti nelle zone di protezione e di sorveglianza condotto secondo la normativa vigente, ha consentito di accertare un solo sospetto clinico che, a seguito di approfondimenti di laboratorio, non è stato confermato.

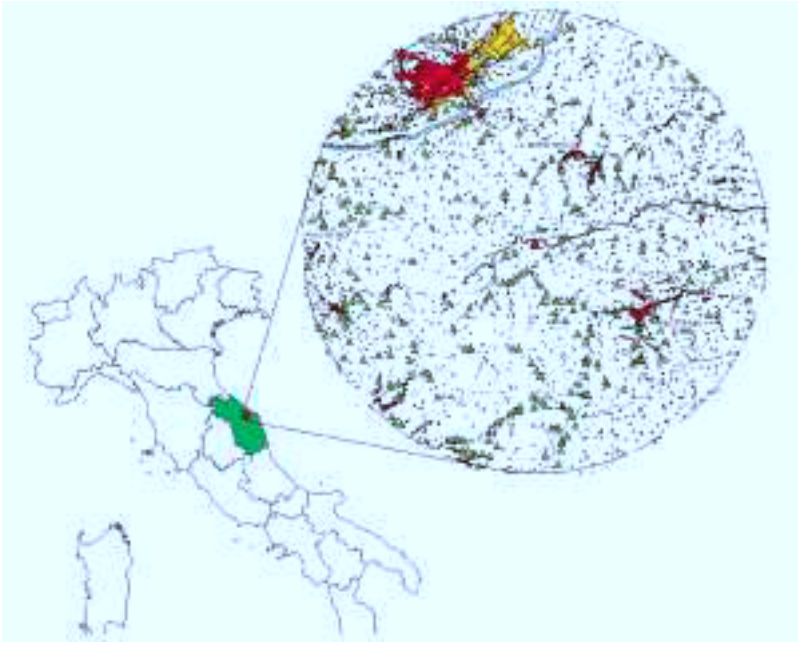


Fig. 1. Zona di sorveglianza e allevamenti suini georeferenziati
Fig. 1. *Surveillance Area and georeferenced pig farms.*

RISULTATI e DISCUSSIONE

L'indagine epidemiologica permetteva di risalire alle seguenti movimentazioni effettuate dall'azienda AN1: negli ultimi 12 mesi erano state introdotte 3 partite di animali:
– in data 27/7/2006, 750 capi dall'Olanda. Questi capi, successivamente, erano stati suddivisi in diverse partite che l'azienda aveva così movimentato: 5 partite erano state destinate a 4 diverse stalle di sosta dell'Abruzzo, del Lazio, della Campania e della Calabria; le altre erano state tutte movimentate verso macelli.
– In data 24/2/2007 e 2/3/2007, 745 capi dalla Danimarca. Questi capi non erano stati movimentati ed erano presenti nell'allevamento al momento della notifica del focolaio (18 capi erano morti in allevamento nei mesi precedenti).
Tutti i capi appartenenti alla prima partita proveniente dall'Olanda erano stati venduti prima di introdurre i capi provenienti dalla Danimarca, ma tra l'uscita della prima partita e l'entrata delle successive c'è stato un intervallo di sole 48 ore, ritenuto troppo breve per poter eseguire una corretta pulizia e disinfezione dell'allevamento.
Le indagini epidemiologiche non hanno permesso di individuare con certezza la fonte di infezione.
L'ipotesi è quella che i suini arrivati dall'Olanda, una volta infettatisi, abbiamo determinato l'infezione indiretta della partita proveniente dalla Danimarca a causa di procedure di risanamento affrettate e superficiali. Resta da capire come possano essersi infettati gli animali provenienti dall'Olanda.
Si ritiene comunque improbabile che l'allevamento marchigiano possa aver rappresentato la fonte di infezione per la stalla di sosta abruzzese per i seguenti motivi:
– I suini inviati in Abruzzo facevano parte della partita omogenea proveniente dall'Olanda, paese dove non sono stati segnalati, nell'ultimo anno, focolai di MVS. Nell'allevamento non erano presenti suini di altra origine.
– I suini di questa partita sono stati inviati in altre 3 stalle di sosta, ma in nessuna di queste sono state rilevate tracce di infezione.
– Il prelievo di suini vivi destinati all'allevamento di Avezzano è stato effettuato dal personale dello stesso. Il proprietario dell'azienda AN1 riporta che il trasportatore è entrato nell'allevamento e si è avvicinato ai box degli animali. Non è da escludere che i suini olandesi dell'azienda di Filottrano siano stati infettati dal personale e dal veicolo dell'allevamento di Avezzano. A dimostrazione di questo i 9 suini risultati positivi alle prove sierologiche appartenevano tutti ai box adiacenti alla porta di ingresso del capannone.
– Negli ultimi anni la sorveglianza per la MVS è stata portata avanti nelle Marche con il dovuto scrupolo e nessun altro focolaio di infezione è stato identificato. In particolare nel 2007 sono state effettuati 25.517 test sierologici in 661 allevamenti industriali nell'ambito del piano di sorveglianza e nessun campione è risultato positivo.

CONCLUSIONI

Come spesso si verifica per la MVS (4), anche in questo caso non è stato possibile comprendere le modalità di insorgenza dell'infezione nel focolaio interessato.

Resta pertanto evidente che la corretta applicazione delle procedure di igiene e profilassi all'interno degli allevamenti continua a costituire una delle armi più efficaci nel controllo della malattia. Altrettanto importante è il controllo della movimentazione degli animali che in alcune zone del centro-sud, per la notevole frammentazione delle dinamiche commerciali (piccole aziende, allevamenti familiari), favorisce la diffusione dell'infezione compromettendo l'indennità delle regioni limitrofe e delle stalle di sosta cui i commercianti si riforniscono.
Il focolaio rappresenta per la regione Marche un evento sporadico e le misure di contenimento dell'infezione adottate rendono improbabile che la stessa possa essere stata diffusa ad altre aziende.
Ciò nonostante, con l'obiettivo di prevenire l'entrata dell'infezione con la movimentazione degli animali, l'Autorità Sanitaria Regionale ha pianificato la progettazione e l'applicazione di misure di biosicurezza per gli allevamenti suini industriali.
Dato inoltre che la normativa nazionale non prevede il controllo routinario degli allevamenti suini da ingrasso, l'Autorità Sanitaria regionale ha disposto che gli allevamenti da ingrasso, che attuino la movimentazione di animali vivi verso altri allevamenti, debbano essere sottoposti agli stessi controlli virologici previsti per le stalle di sosta .

BIBLIOGRAFIA

1) O.M. 26 Luglio 2001, G.U.R.I. n° 221 (22.09.2001)
2) Bellini S. (2003) "Valuatazione della situazione epidemiologica della Malattia Vescicolare del Suino in Italia e considerazione sulle attività di controllo previste". L'Osservatorio, Anno 6, n°3.
3) Brocchi E., Berlinzani A., Gamba D., De Simone F. (1995). "Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus" (1995). Jounal of Virological Methods, 52, 1995, 155-167.
4) Lin F., Kitching (2000) "Swine Vesicular Disease: an overview". The Vet. Jour. 2000, 160, 192-201.

"PROGETTO AUJESZKY 2007" DELLA REGIONE PIEMONTE

"AUJESZKY DISEASE PROJECT 2007"

B. SONA[1], S. ORIGLIA[2], S. VIARA[2], M.E. CAREDDU[3], F. ROSSO[4]
[1] Veterinario Dirigente A.S.L.CN1, responsabile coordinatore del progetto "Aujeszky 2007"Regione Piemonte; [2] Veterinario L.P., Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN), facoltà di Medicina Veterinaria della Università di Torino; [3] I.Z.S. Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Cuneo; [4] Servizi Veterinari della Regione Piemonte, Settore Igiene degli Allevamenti.

Parole chiave: Malattia di Aujeszky, suino, profilassi
Keywords: Aujeszky disease, swine, prophylaxis

Riassunto. Lo scopo di questo lavoro è descrivere un piano regionale denominato "Progetto Aujeszky 2007 " realizzato in Regione Piemonte. Il progetto ha coinvolto 30 aziende selezionate in 24 comuni appartenenti a 12 diverse AASSLL al fine di far loro acquisire una qualifica sanitaria importante come quella di allevamento indenne da Malattia di Aujeszky.
In un primo tempo è stata eseguita una visita in allevamento compilando una scheda di preadesione. Successivamente si è effettuato un campionamento con prelievo si sangue su 60 soggetti (numero statisticamente significativo per la prevalenza attuale) ; sulla base di dati anamnestici e degli esiti di laboratorio le aziende sono state suddivise per categorie : positive, negative, indenni.
Durante lo svolgimento delle varie fasi del progetto sono stati messi in evidenza i punti di forza e critici del piano nazionale. I dati raccolti hanno consentito di iniziare a costruire il "puzzle" epidemiologico reale della Malattia di Aujeszky nel territorio della Regione Piemonte, in particolare di alcune zone ad elevata concentrazione suinicola ove è assolutamente improbabile raggiungere e mantenere nel tempo l'indennità della singola azienda senza tenere conto della situazione epidemiologica del territorio ad essa circostante.

Abstract. The paper aims to describe the "Aujeszky disease project 2007", a local veterinary plan carried out in Piedmont region. The project involved 30 herds located in 24 municipalities served by 12 health units (AASSLL). The target was to achieve a biosecurity higher guarantees and the Aujeszky disease free status.
As the first step, an inspection in each herd was carried out and a special form to confirm the agreement of the breeder was filled and signed by both parties, then 60 heads were sampled (number given on the basis of the present prevalence of the disease).
According with the results of the tests and with the anamnesis, the herds were classified in 3 categories: positive, negative and free from Aujeszky disease.
The project highlight strengths and weaknesses of the national plan. Information collected during the study gave chance to better understand the epidemiologic picture of

Aujeszky disease in Piedmont region, particularly in areas with high concentration of swine herds where it is very difficult to achieve and maintain the free status in each single herd without considering the situation in the surrounding area.

Considerata la necessità di garantire un costante miglioramento della sanità dei suini allevati, di elevare il livello di protezione verso le malattie infettive ad alta diffusibilità, in particolare di proteggere e salvaguardare gli allevamenti già indenni dalla Malattia di Aujeszky (A.D.), nel 2007 in Piemonte è stato avviato un programma straordinario al fine di permettere alle aziende che presentano adeguati requisiti strutturali e funzionali di elevare il loro status sanitario.
Molti Paesi della U.E. hanno applicato da tempo programmi di lotta per l'A.D. ed in molti casi hanno raggiunto la completa eradicazione.
L'Italia ha in atto da dieci anni un Piano Nazionale di Controllo (D.M. 1 aprile 1997) il quale prevede uno schema vaccinale obbligatorio e l'applicazione di misure di profilassi diretta.
Nonostante ciò la prevalenza degli allevamenti sieropositivi in Piemonte è negli anni diminuita assai lentamente, raggiungendo attualmente circa il 36%. (tab.1)

Tab. 1. Andamento pluriennale della sieropositività in Piemonte (Piano Nazionale di Controllo – D.M. 01.04.1997)
Tab. 1. *Trend of positive herds during the years in Piedmont region (National control plan – D.M. 01.04.1997)*

1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
56.6%	61.1%	48.5%	36.1%	38.4%	41.0%	43.6%	35.7%

fonte: "Relazione di attività" annuali dei Servizi Veterinari della Regione Piemonte.
source: "Annual report of the Veterinary Services activities in Regione Piemonte"

Il Programma straordinario piemontese non và ovviamente a sostituire il Piano Nazionale di Controllo ma ne integra le misure, apportando dei correttivi ai punti critici emersi nel corso dei dieci anni della sua applicazione.
Il D.M. 1 aprile 1997 prevede siano controllati esclusivamente degli allevamenti da riproduzione, sia a "ciclo aperto" che a "ciclo chiuso", con più di 6 riproduttori.
Sfuggono pertanto alla verifica mediante esame sierologico le piccole aziende rurali o per "autoconsumo", che rappresentano tuttavia una realtà ancora importante in alcune zone. In particolar modo in territori collinari o pedemontani gli allevamenti "famigliari" sono ancora piuttosto numerosi e non di rado si trovano in stretta convivenza con allevamenti di tipo intensivo
Il Piano Nazionale non prevede inoltre alcun controllo delle strutture esclusivamente da ingrasso (né in stalla, né al macello), nonostante sia stato dimostrato come proprio tale tipologia di allevamento rappresenti il vero *"reservoir"* del virus, soprattutto laddove non sia rispettato il piano vaccinale previsto.
Gli allevamenti censiti In Piemonte nel 2006 sono stati complessivamente (riproduzione + ingrasso, compresi i "famigliari") 2.215.

Le aziende controllate nel corso dello stesso anno in ottemperanza a quanto disposto dal Piano Nazionale sono state 423, pari pertanto al solo 19% circa del totale.
Il Piano Nazionale inoltre non prevede alcuna garanzia sanitaria relativa all'A.D. dei capi da rimonta. Solo gli allevamenti che hanno già a loro volta acquisito la qualifica di indenne sono obbligati ad acquistare capi provenienti da aziende riconosciute indenni. Le aziende da riproduzione prive di qualifica possono introdurre liberamente scrofette e verri provenienti da centri di selezione non indenni (se non addirittura sieropositivi!).
E' inoltre stabilito che solo gli accertamenti sierologici effettuati dal Veterinario Ufficiale dell' A.S.L. per la verifica dell'andamento del Piano (12 campioni una sola volta all'anno) siano eseguiti gratuitamente mentre sono previsti a spese dell'allevatore i prelievi fatti dal Veterinario Ufficiale per l'acquisizione della qualifica e quelli, a cadenza quadrimestrale, per il suo successivo mantenimento.
Nel caso poi di un'azienda positiva che voglia effettuare il "risanamento", applicando ad esempio il metodo *"test and removal",* non è chiaro chi debba eseguire i prelievi di sangue per gli accertamenti sierologici (il Veterinario aziendale? il Veterinario pubblico? un Libero Professionista?) nè chi debba eseguire le analisi (l'Istituto Zooprofilattico competente per territorio o anche un' altro I.Z.S.? un laboratorio privato accreditato?).
È necessario infine considerare che in dieci anni è mutata non solo la situazione epidemiologica dell'A.D. ma la suinicoltura stessa: sono cambiati i sistemi di allevamento , con ad esempio un più ampio utilizzo del sistema "a bande" e del "multisede", c'è una maggior attenzione nella applicazione delle misure di biosicurezza (la Malattia Vescicolare *docet*), le filiere produttive sono maggiormente "integrate" rispetto al passato.
In seguito a queste considerazioni e per adeguarsi alle più recenti esigenze sanitarie, nel 2007 in Piemonte è stato avviato un programma volontario per gli allevamenti da riproduzione che siano intenzionati ad acquisire la qualifica di "indenne - ad elevato standard sanitario", come determinato mediante la Delibera della Giunta Regionale n° 34 - 5440 del 5 marzo 2007.
Innanzitutto viene stabilito che tutti i riproduttori suini introdotti negli allevamenti piemontesi, indipendentemente dalla qualifica sanitaria dell'azienda destinataria, devono provenire da strutture già riconosciute indenni o, in alternativa, essere stati preventivamente testati nei trenta giorni antecedenti lo spostamento.
In tal modo, fermo restando che chi è già indenne deve obbligatoriamente introdurre animali di pari o superiore qualifica, anche l'allevatore la cui azienda non abbia ancora raggiunto tale traguardo ha la possibilità di essere informato sullo stato sanitario dei soggetti da riproduzione di nuovo acquisto.
Cosa propone inoltre il programma regionale piemontese in più rispetto al D.M. 1 aprile 1997?
– I controlli per l'acquisizione ed il mantenimento della qualifica sono gratuiti. L'allevatore che aderisce al programma ha diritto ad ottenere senza alcuna spesa tutti i controlli sierologici atti ad acquisire e mantenere nel tempo la qualifica sanitaria.
– Il controllo dei riproduttori di nuovo acquisto. Nelle aziende aderenti al programma, anche se non ancora indenni, possono essere introdotti esclusivamente soggetti sieronegativi che devono essere posti in isolamento e sottoposti a nuovo accertamento sie-

rologico, trascorsi almeno 20 giorni, prima di essere inseriti nel parco riproduttori. Anche questi accertamenti diagnostici sono eseguiti dal Veterinario Ufficiale a titolo gratuito.

– *Il controllo degli allevamenti limitrofi.* Attorno ad ogni azienda aderente al programma viene istituita una "zona di attenzione", di raggio variabile da uno a cinque chilometri in relazione alla situazione territoriale, epidemiologica e zootecnica. Tutti gli allevamenti suini presenti in tale area, indipendentemente dalla loro tipologia e dalle dimensioni, quindi anche se "solo ingrasso" o "famigliari", vengono sottoposti a controllo sierologico per l'A.D.. L'indagine è volta non solo a verificare la situazione epidemiologica del territorio circostante l'azienda aderente ma anche ad evidenziare eventuali irregolarità nell'esecuzione dei piani vaccinali, quali l'omissione o la non corretta esecuzione della "terza vaccinazione" obbligatoria nei soggetti all'ingrasso fra il 6° ed il 7° mese di età.

– *Assistenza agli "allevamenti problema".* Nel caso nell'azienda aderente al programma emergano dei problemi, quali positività sierologiche sporadiche, rotture di immunità, reinfezioni, ecc., è cura del Veterinario pubblico, in stretta collaborazione con l'allevatore ed il Veterinario aziendale, mettere in atto una scrupolosa indagine epidemiologica tesa ad accertare le cause che hanno determinato l'evento, istituire un sistema di controllo, quale ad esempio un monitoraggio mediante suini "sentinella", in grado di valutare l'evoluzione della situazione in allevamento al fine di attivare le possibili misure correttive. Anche in tal caso gli accertamenti di laboratorio che si rendano necessari sono eseguiti gratuitamente dal Servizio Sanitario pubblico.

Nell'ambito del programma regionale è stato finanziato un "Progetto pilota" da realizzarsi su 30 aziende selezionate in 24 diversi Comuni in tutta la Regione (Tab.2)

Tab. 2. Distribuzione geografica delle aziende aderenti al Progetto.
Tab. 2. *Geographical distribution of herds involved in the project.*

A.S.L. PIEMONTE	Comune	n° allevamenti
6 CIRIE'/VENARIA	S.Francesco al Campo	1
8 CHIERI	Riva presso Chieri	1
10 PINEROLO	Scalenghe - Villafranca P.te	2
11 VERCELLI	Borgo d'Ale - Formigliana - Livorno F.	3
12 BIELLA	Salussola	1
13 NOVARA	Castellazzo N. - S.Pietro Nosezzo	2
15 CUNEO	Caraglio - Margarita - Margarita	3
16 MONDOVI'	Pianfei - Magliano Alpi - Magliano Alpi	3
17/1 FOSSANO/SAVIGLIANO	Genola - Racconigi -Trinità -Villafalletto Villafalletto - Villafalletto	6
17/2 SALUZZO	Piasco - Saluzzo - Saluzzo	3
18 ALBA - BRA	Bra - Bra - Castino - Sommariva Perno	4
19 ASTI	Villanova d'Asti	1
12 AA.SS.LL.	**24 COMUNI**	**30 allevamenti**

A tal fine è stato creato un gruppo di lavoro col compito di coordinare il progetto e coadiuvare il personale delle A.S.L. nella sua realizzazione.

Gli obiettivi che ci si è posti sono sostanzialmente tre:
– Svolgere la funzione di *"starter"* per il Programma Regionale, elevando lo stato sanitario di quelle aziende che hanno potenzialità per raggiungere buoni standard qualitativi, inducendo altri allevatori a seguirne l'esempio.
– Verificare su un numero ridotto di aziende la "fattibilità", nelle diverse realtà territoriali regionali, di un piano sanitario che inizialmente è "di controllo" ma che dovrà diventare in una fase successiva "di eradicazione", valutandone i vari aspetti logistici ed operativi (programmazione, costi, impiego di personale, ecc.)
– Valutare le possibili soluzioni a problemi emergenti in fase di attuazione.

MATERIALI E METODI

Come è avvenuta la selezione delle trenta aziende?
– *Segnalazione del Veterinario A.S.L.:* i Colleghi delle A.S.L. competenti per territorio hanno informato gli allevatori dell'iniziativa regionale ed hanno successivamente segnalato le aziende che erano intenzionate ad aderire al programma volontario.
– *Preadesione:* alla segnalazione è seguita una visita di allevamento nel corso della quale è stata valutata la situazione strutturale e gestionale al fine di verificare la reale possibilità di realizzazione del programma.
– *1° controllo sierologico* (60 campioni sui riproduttori); un primo campionamento statisticamente significativo che ha permesso di stabilire la situazione sierologica dell'allevamento.
– *Adesione al piano.* Sulla scorta degli esiti degli accertamenti sierologici e della visita di allevamento sono stati concordati il piano di biosicurezza, il programma vaccinale, gli interventi diagnostici e correttivi, sottoscrivendo infine l'adesione al progetto e l'impegno ad effettuare quanto stabilito fra le parti (Allevatore/Veterinario Aziendale/Veterinario Pubblico).
Dei trenta allevamenti selezionati ben 24 sono da riproduzione a "ciclo aperto", con vendita totale o parziale dei suinetti prodotti, e 4 sono a "ciclo chiuso", in cui tutti i soggetti nati in azienda sono destinati al macello. Sono stati inseriti nel progetto anche un "sito 2" di svezzamento (fase intermedia con destinazione ingrasso), collegato a scrofaie già indenni, ed un "centro verri" per la produzione di seme per la fecondazione artificiale.
13 di questi allevamenti si trovano in una zona a bassa densità suinicola, 5 in un territorio con densità media. Ben 12 sono ubicati in zone ad elevata densità di allevamento suino.
Nessuna delle 30 aziende selezionate aveva già acquisito in precedenza la qualifica di indenne.
5 risultavano sieropositive; 3 sono state considerate negative, avendo già in precedenza effettuato un controllo mediante campionamento statisticamente significativo con esito favorevole; 22 allevamenti erano stati in precedenza controllati esclusivamente con le modalità previste dal Piano Nazionale di Controllo (12 campioni all'anno) per cui di fatto il reale stato sanitario risultava sconosciuto (Tab.3).

Tab. 3. …… 1°gennaio 2007
Tab. 3. *……1st January 2007*

Allevamenti positivi	Allevamenti senza qualifica	Allevamenti negativi	Allevamenti indenni
5	22	3	0

RISULTATI

Dopo sei mesi di lavoro la situazione era quella riportata nella Tab 4.

Tab. 4. …… 30 giugno 2007
Tab. 4. *…… 30th June 2007*

Allevamenti positivi	Allevamenti senza qualifica	Allevamenti negativi	Allevamenti indenni
5	0	8	17

Ovviamente a Giugno non vi erano più aziende senza qualifica, in quanto tutte controllate mediante doppio campionamento statisticamente significativo a distanza di almeno 28 giorni.
17 di esse hanno acquisito la qualifica di indenne.
2 allevamenti positivi a Gennaio hanno continuato a restare tali mentre altri 3 si sono negativizzati; 3 allevamenti "senza qualifica", sieronegativi ai 12 campioni previsti dal piano Nazionale, ampliando il campionamento, hanno evidenziato delle sieropositività più o meno estese.
Entro il mese di Novembre 2007 gli allevamenti riconosciuti indenni sono stati 21 (Tab. 5).

Tab. 5. …… 1° novembre 2007
Tab. 5. …… *1st Novembre 2007*

Allevamenti positivi	Allevamenti senza qualifica	Allevamenti negativi	Allevamenti indenni
9	0	0	21

Dei 9 positivi 2 soli presentano ancora una sieroprevalenza elevata tale da far presupporre vi sia ancora una intensa circolazione virale in azienda.
In una azienda la sieropositività risulta relegata alle scrofe pluripare, mentre primipare, scrofette e suinetti restano sieronegativi. In un'altra la sieropositività è stata rilevata esclusivamente in scrofette di nuova introduzione, tutte della stessa partita e provenienza.
Infine in ben cinque casi la sieropositività è riconducibile a quelli che potrebbero essere definiti dei "singleton reactors", in analogia a quanto previsto per altre malattie virali del suino.

DISCUSSIONE

Una sostanziale valutazione dei risultati ottenuti potrà essere fatta solo nella primavera 2008, con l'elaborazione dei dati raccolti alla conclusione dei primi dodici mesi di attività in campo: sarebbe pertanto prematuro trarre delle conclusioni definitive, seppur in apparenza positive, sull'andamento del progetto.
L'obiettivo, realistico, è di riuscire a portare almeno 25 delle 30 aziende ad acquisire stabilmente l'indennità da A.D. nel corso del 2008 (Tab.6).

Tab. 6. …… 2008 ?

Allevamenti positivi	Allevamenti senza qualifica	Allevamenti negativi	Allevamenti indenni
5	0	0	25

In ben 7 dei 9 allevamenti ancora dichiarati positivi le indagini diagnostiche indicano una bassissima circolazione del virus. Non è mai stata rilevata in allevamento una sintomatologia riferibile all'A.D., la sieropositività è relegata ad uno o pochi capi, non si rileva sieroconversione nei soggetti "sentinella" o in altri soggetti a contatto.
In un caso (2 campioni sieropositivi su 243 prelevati) un successivo test di controllo mediante l'impiego di un differente kit ELISA ha dato esito negativo. In un altro caso lo stesso soggetto risultato sieropositivo riprelevato trascorsi 15 giorni si è negativizzato.
Va tuttavia considerato che il rischio che non si tratti di "falsi positivi" ma di indicatori di una reinfezione in corso resta reale in considerazione della prevalenza ancora significativa che l'A.D. continua ad avere non solo sul territorio Piemontese ma anche in altre Regioni con le quali si lo scambio commerciale di suini è intenso. I controlli eseguiti nelle "zone di attenzione" istituite attorno alle 30 aziende in esame confermano come oltre il 31% degli allevamenti sia ancora gE positivo e dati riportati in bibliografia segnalano percentuali ancora superiori.

CONCLUSIONI

I problemi emersi in questi primi mesi di lavoro, quali il riscontro di "sigleton reactors" o di sieropositività sporadiche, il verificarsi di esiti differenti utilizzando test diagnostici diversi, la difficoltà di valutazione della esecuzione della "terza vaccinazione" nei maiali in ingrasso, hanno indotto a prolungare di almeno altri sei mesi il progetto onde poter approfondire maggiormente le problematiche evidenziate, anche perché altri allevatori hanno già manifestato l'intenzione di aderire al Programma volontario regionale.
Allo stato dell'arte non è inoltre possibile esprimere una realistica valutazione dei costi di attuazione sia perchè il progetto non è ancora ultimato, sia perchè potrebbero subire significative variazioni in funzione degli approfondimenti diagnostici che si rendano necessari al suo completamento.

Indubbiamente un primo risultato è però già stato raggiunto: la grande quantità di dati raccolti e soprattutto l'esperienza acquisita operando in aziende e situazioni territoriali in molti casi assai differenti fra loro permettono di ricostruire il "puzzle" epidemiologico della Malattia di Aujeszky nel territorio della Regione Piemonte, in particolare di alcune zone ad elevata concentrazione suinicola ove è assolutamente impensabile pensare di raggiungere e mantenere nel tempo l'indennità della singola azienda senza tenere conto della situazione epidemiologica del territorio ad essa circostante.

Bibliografia

Alborali L., Guadagnini G., Accini A., Zanoni M., Salogni C.,Cordioli P. (2007) "Sieroprevalenza della Malattia di Aujeszky in suini pesanti macellati in Pianura Padana". Atti del XXXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Modena 29-30 marzo 2007, 283-287.

Lelli D., Luppi A., Sozzi E., Moreno A., Cordioli P., Lombardi G. (2007) "Confronto tra test sierologici gE-ELISA per la Malattia di Aujeszky utilizzando sieri di suini infettati sperimentalmente". Atti del XXXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Modena 29-30 marzo 2007, 359-364..

Abbona D., Drigo M., Martini M., Sona B., Venturino E., (2006) "Modellizzazione matematica della Malattia di Aujeszky in un'area ad altissima densità di allevamenti suini della Provincia di Cuneo". Atti del XXXII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Modena 23-24 marzo 2006, 219-231.

Ostanello F., Bianchi M., Dottori M., Cappuccio P., Leotti G. (2005) "Gestione della rimonta come strumento di controllo aziendale della Malattia di Aujeszky". Atti del XXXI Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Mantova 17-18 marzo 2005, 451-458.

Bolla C. (2005) "Monitoraggio della Malattia di Aujeszky, applicazioni in campo e prospettive". Atti del XXXI Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Mantova 17-18 marzo 2005, 315-319..

Martano G., Fedele V., Lambiase A., Radicati di Primeglio F. (2005) "Studio sulla sieropositività per il virus della Malattia di Aujeszky in allevamenti suini del Pinerolese: correlazioni con fattori gestionali e geografici". Atti del XXXI Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Mantova 17-18 marzo 2005, 413-419.

Martini M., Drigo M., Dalla Pozza M., Ferrari G., Sona B. (2003) "A study of the progress of the Aujeszky's Disease control programme in Italy using survival analysis". Journal Veterinary Medicine B50 , 191-195.

Tamba M., Calabrese R., Finelli E., Cordioli P. (2002) "Risk factors of Aujeszky's disease seropositivity of swine heards of a region of northern Italy". Preventive Veterinary Medicine 54 , 167-173.

Tancredi E., Giobbio E., Masoero L., Mannelli A.(2002),"Effetto dei fattori gestionali e geografici sulla sieropositività per il virus della Malattia di Aujeszky in allevamenti suini in Piemonte". Atti del XXVIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Piacenza 14-15 marzo 2002, 251-263.

TIPIZZAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI SUINI CON ANTICORPI MONOCLONALI

SWINE INFLUENZA VIRUSES TYPING WITH MONOCLONAL ANTYBODIES

LELLI D., MORENO A., SOZZI E., LUPPI A., CANELLI E., BROCCHI E., CORDIOLI P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole Chiave: virus influenzali suini, anticorpi monoclonali.
Key Words: swine influenza viruses, monoclonal antibodies.

Riassunto. Anticorpi monoclonali (Mabs) specifici per H1, H3, N1, N2 (rispettivamente 2C2, 5F10, 5B2 e 5B11) sono stati selezionati ed utilizzati per la messa a punto di una ELISA sandwich, successivamente impiegata per la tipizzazione di 37 virus influenzali suini dei quali 14 H1N1, 16 H3N2 e 7 H1N2.
Il Mab 2C2 anti-H1 ha tipizzato correttamente 13 su 14 ceppi H1N1 e 1 su 7 H1N2, il Mab 5F10 anti-H3 ha tipizzato 11 su 16 ceppi H3N2**,** il Mab 5B2 anti-N1 ha identificato 13 su 14 ceppi H1N1 ed il Mab 5B11 anti-N2 ha tipizzato 16 su 16 ceppi H3N2 e 4 su 7 ceppi H1N2.
I Mabs utilizzati hanno identificato con una buona sensibilità l'emoagglutinina H1 dei ceppi H1N1 e la neuraminidasi N1 e N2 dei ceppi H1N1 e H3N2, ma non sono stati in grado di identificare i ceppi H1N2 per i quali si provvederà alla produzione di Mabs specifici.
E' interessante notare come l'unico ceppo H1N1 (5433/01), non identificato dal Mab 2C2 anti-H1 abbia dimostrato, sulla base del sequenziamento del gene HA effettuato in un precedente studio, di possedere una correlazione genetica maggiore con i virus H1N2, rispetto ai virus H1N1 isolati negli stessi anni. Sempre nello stesso contesto, l'unico ceppo H1N2 tipizzato dal Mab 2C2 presenta, sulla base del sequenziamento del gene HA, un'elevata omologia genetica con i ceppi H1N1.

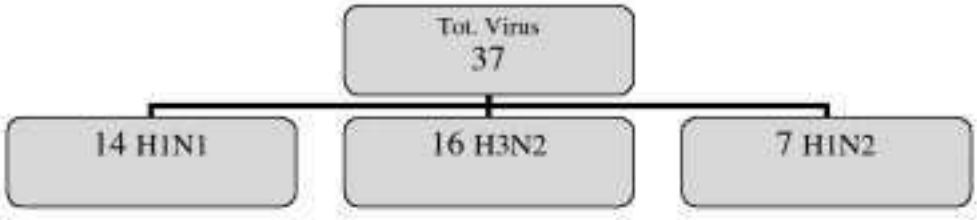
Abstract. Monoclonal antibodies specific for H1, H3, N1, N2 have been produced, characterized and used to develop sandwich-ELISA. This ELISA test was used to type 37 swine influenza viruses belonged to 14 H1N1, 16 H3N2 and 7 H1N2 subtypes. All the H1N1 strains, except one, exhibited strong reactivity in the H1-ELISA and N1-ELISA (Mabs 2C2 and 5B2 respectively) but, in contrast, only a H1N2 strain resulted positive in the H1-ELISA.
The H1-ELISA, N1-ELISA and N2-ELISA developed, showed high specificity and sensitivity, enabled the identification of H1N1 and H3N2 swine influenza virus strains. In contrast, these tests showed a very low sensitivity in the identification of H1N2 strains. The H1N1 strain (5433/01) that reacted negative in the H1-ELISA, showed a strong genetic relationship regarding the HA gene of H1N2 viruses. In contrast, the only H1N2 strain typed by the H1-ELISA, showed a HA gene sequence closed related with the H1N1 HA genes, as described in a previously work (4).

Introduzione

L'influenza suina è una importante causa di patologia respiratoria acuta nell'allevamento suino. I principali ceppi influenzali coinvolti nell'eziologia di questa malattia sono l'H1N1, l'H3N2, e l'H1N2. In Italia si assiste alla contemporanea circolazione dei tre sottotipi virali sopraccitati, anche se il sottotipo H1N2, ha in realtà scarsa diffusione nel nostro paese, con una prevalenza leggermente superiore nel Nord Italia (1,2,3). Con lo scopo di monitorare la circolazione dei virus influenzali suini, l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) ha reso sistematico un programma di screening teso non solo alla verifica della presenza di questi virus ma anche allo studio delle caratteristiche antigeniche e genetiche dei ceppi circolanti nell'area geografica di competenza.
La tipizzazione delle glicoproteine di superficie, emoagglutinina e neuraminidasi, rappresenta il punto cruciale per lo studio dell'evoluzione e dell'epidemiologia di virus influenzali e generalmente viene eseguita sia con metodi sierologici "classici", come l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) e l'inibizione della neuraminidasi (NI), sia con tecniche biomolecolari (RT-PCR).
Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre anticorpi monoclonali (Mabs) da impiegare nella standardizzazione di un test ELISA, da affiancare ai test sopraccitati, per la tipizzazione dei virus influenzali suini.

Materiali e metodi

Virus
In questo studio sono stati utilizzati 37 virus influenzali suini isolati su uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni d'età o su monostrato cellulare MDCK (Madin Darby canine kidney) partendo da matrici biologiche quali omogenati di polmoni e tamponi nasali provenienti da suini con sintomi clinici e lesioni anatomo-patologiche riferibili a malattia respiratoria acuta.
Tutti i 37 virus oggetto di questo studio sono stati tipizzati e sequenziati in un precedente lavoro (4), di questi 14 appartenevano al sottotipo H1N1, 16 al sottotipo H3N2 e 7 al sottotipo H1N2.



Virus utilizzati per la produzione di anticorpi monoclonali:
- H1N1 A/goose/Italy/2003

- H1N1 A/sw/Italy/125746/05
- H3N2 A/sw/OMS 3633/84

Per la preparazione dell'antigene da impiegare nella produzione degli anticorpi monoclonali, i virus sono stati coltivati su uova embrionate di pollo di 9-11 giorni, tramite inoculo in cavità allantoidea. Dopo 3 giorni dall'inoculo, il liquido allantoideo raccolto è sottoposto ad una parziale purificazione mediante ultra-centrifugazione a 35000 rpm per 2 ore su cuscino di saccarosio al 25% (w/w). Il pellet ottenuto è stato risospeso in tampone PBS pH 7,4 in un centesimo del volume iniziale. Dopo averne determinato il contenuto proteico, gli antigeni così preparati sono stati stoccati in congelatore a -70°C pronti per essere inoculati in topi Balb/c.

Anticorpi monoclonali

L'antigene prodotto con le modalità precedentemente descritte è stato impiegato per l'immunizzazione di Topi Balb/c mediante inoculazione sottocutanea di 100 µg di antigene parzialmente purificato ed emulsionato con adiuvante di Freund completo. Dopo 30 giorni è stata eseguita una seconda inoculazione per via intraperitoneale con antigene non adiuvato e dopo tre giorni, gli splenociti murini sono stati ibridizzati con cellule di mieloma murino NS0 in presenza di PEG 4000 secondo metodica standardizzata (5).

Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante ELISA indiretta, adottando lo stesso antigene utilizzato come immunogeno e un altro virus influenzale diversificato nella composizione degli antigeni H ed N. Sono stati selezionati gli ibridomi che hanno mostrato reattività nei confronti del virus omologo, escludendo quelli cross-reattivi.

L' identificazione dei Mabs specifici per il sottotipo di emoagglutinina e neuraminidasi desiderato è stata eseguita confrontando la reattività in ELISA indiretta tra il virus omologo ed altri virus influenzali suini appartenenti ai diversi sottotipi. Inoltre, attraverso una serie di reazioni ELISA competitiva, è stata valutata la competizione reciproca tra i Mabs prodotti e ritenuti specifici per H o N e sieri immuni prodotti in polli SPF infettati sperimentalmente con virus influenzali suini H1N1, H3N2 e H1N2.

La selezione dei Mabs è stata inoltre condotta mediante HI, utilizzando inizialmente il ceppo omologo ed in seguito, anche altri ceppi appartenenti al medesimo sottotipo. I Mabs che facevano presupporre una reattività per la neuraminidasi sono stati inoltre saggiati tramite NI. Sulla base dei risultati ottenuti da queste prove sono stati selezionati alcuni monoclonali da utilizzare in reazioni ELISA sandwich per la tipizzazione dei virus influenzali suini.

Gli ibridomi selezionati, producenti anticorpi reattivi verso l'antigene virale desiderato, sono stati clonati mediante diluizione limite e coniugati con l'enzima perossidasi di rafano (Horse Radish Peroxidase, Hrp) (6).

Risultati

Identificazione degli anticorpi monoclonali.

Attraverso i procedimenti di fusione sono stati ottenuti un cospicuo numero di ibridomi producenti anticorpi monoclonali specifici per H1,H3,N1,N2.

Sono stati selezionati i Mabs per i quali il legame all'antigene era inibito esclusivamente dai sieri policlonali di pollo con H e N omologa (ELISA competitiva) e che mostravano reattività nei confronti dei soli virus con H e N dello stesso sottotipo (ELISA indiretta). Per ogni monoclonale è stata valutata inoltre la reattività e l'affinità quando utilizzato come cattura e coniugato in ELISA sandwich.
I Mabs selezionati ed i rispettivi ceppi virali che li hanno generati sono riportati nella tabella 1.

Tab. 1. Mabs selezionati per la tipizzazione di virus influenzali suini.
Tab. 1. *Mabs selected for swine influenza viruses-typing.*

Mab	H/N	Virus
2C2	Anti-H1	H1N1 A/sw/Italy/125746/05
5F10	Anti-H3	H3N2A/sw/OMS3633/84
5B2	Anti-N1	H1N1A/goose/Italy/2003
5B11	Anti-N2	H3N2A/sw/OMS/3633/84

Il Mab 2C2 ha presentato attività inibente l'emoagglutinazione ad alto titolo nei confronti del virus omologo e di altri ceppi appartenenti allo stesso sottotipo. Anche il Mab 5F10 ha dimostrato possedere, seppur a basso titolo, attività inibente l'emoagglutinazione nei confronti di ceppi H3N2.
I monoclonali 5B2 e 5B11, specifici rispettivamente per N1 e N2, hanno evidenziato attività inibente la neuraminidasi sottotipo specifica.

Reattività in ELISA degli anticorpi monoclonali.
Ogni Mab selezionato è stato utilizzato come cattura e coniugato per allestire una ELISA sandwich con la quale tipizzare i 37 virus oggetto del presente studio. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

Tab. 2. Risultati della tipizzazione dei virus influenzali suini ottenuti utilizzando il test l'ELISA-sandwich messo a punto.
Tab. 2. *Results of swine influenza viruses typing using sandwich-ELISA.*

Mab (catcher/tracer)	Virus tipizzati	Risultato
2C2	H1N1	13 su 14
	H1N2	1 su 7
5F10	H3N2	11 su 16
5B2	H1N1	13 su 14
5B11	H3N2	16 su 16
	H1N2	4 su 7

I Monoclonali testati in ELISA sandwich hanno evidenziato una buona specificità senza alcuna reattività crociata nei confronti di emoagglutinine e neuraminidasi eterologhe.

Diverso è il discorso sulla sensibilità in quanto, il monoclonale 2C2 ha evidenziato una sensibilità del 92%, riconoscendo 13/14 ceppi di H1N1, e solo 1 ceppo su 7 H1N2. La reazione ELISA con il Mab 5F10 specifico H3 è stato in grado di evidenziare positività su 11 dei 16 ceppi identificati come H3 (68%). Migliori risultati si sono ottenuti con i Mabs specifici per le neuraminidasi.
Nella figura 1 è riportato un esempio della reazione ELISA sandwich per la tipizzazione dei virus influenzali suini.

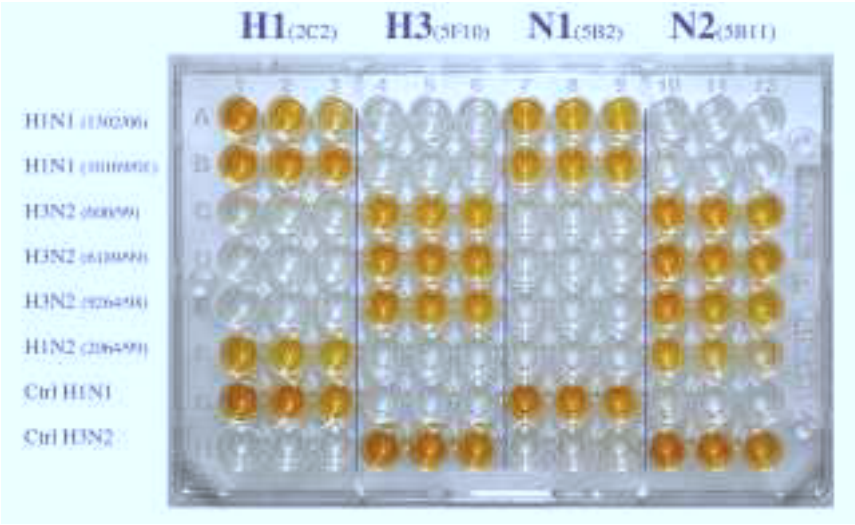


Fig. 1. ELISA sandwich per la tipizzazione di virus influenzali suini.
Fig. 1. *Sandwich ELISA for swine influenza viruses typing.*

Discussione e conclusioni

Gli anticorpi monoclonali prodotti hanno dimostrato possedere una buona specificità senza evidenziare alcuna reazione crociata nei confronti di emoaglutinine e neuraminidasi eterologhe.
Il presente studio ha permesso di identificare anticorpi monoclonali dotati di buona sensibilità utilizzabili per la tipizzazione delle glicoproteine di superficie H1 e N1 dei ceppi H1N1 e della neuraminidasi tipo 2 dei ceppi H3N2.
La variabilità antigenica a livello di glicoproteine H1 ed N2 dei ceppi H1N2, rispetto a quelle dei virus H3N2 ed H1N1 non ha permesso di tipizzare, con i Mabs selezionati, i ceppi H1N2. Inoltre, la variabilità presente a livello di H3, rende necessaria la ricerca di altri Monoclonali per ampliare il numero di ceppi identificati.
E' interessante notare come l'unico ceppo H1N1 (5433/01) non identificato dal Mab 2C2, sulla base del sequenziamento del gene HA effettuata in un precedente studio, appare strettamente correlato con i virus H1N2 mentre, l'unico ceppo H1N2

(sw/It/2064/99) tipizzato dal Mab 2C2, al contrario, presenta una elevata omologia per il gene HA con ceppi H1N1 (3).
La possibilità d'impiegare gli anticorpi monoclonali in metodiche ELISA presenta notevoli vantaggi nella pratica diagnostica, in quanto conferiscono caratteristiche di inesauribilità, standardizzazione ed uniformità, ovviando alle problematiche legate all'utilizzo di sieri policlonali.

Bibliografia

1.Heinen D.P. (2002) "Swine influenza: a zoonosis". Veterinary Sciences Tomorrow, 1-11.
2.Janke B.H. (1998) "Classic swine influenza". Large Anim. Pract. 19: 24-29.
3.Marozin S., Gregory V., Cameron K., Bennet M., Valette M., Aymard M., Foni E., 3.Barigazzi G., Lin Y., Hay A. (2002) "Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe". J. Gen. Virol. 83: 735-745.
4.Luppi A., Barbieri I., Moreno A.M., Lelli D., Sozzi E., Zanoni M.G., Fiorentini L., Alborali L., Cordioli P. (2007). Caratterizzazione genetica delle emoagglutinine e neuraminidasi di virus influenzali suini circolanti nel nord Italia nel periodo 1998 – 2006. *XXXIII meeting annuale della SIPAS*, Modena, Atti, 232-242.
5. Galfre G. and Milstein C. (1981). "Preparation of monoclonal antibodies, strategies and procedure". *Methods Enzymol* 73: 3-5.
6. Tjissen P., Kurstak E. (1984). Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidae-antibodies conjugates for enzyme immunoassays. *Analalyt Biochem* 136: 451-457.

INFEZIONE SPERIMENTALE IN SUINI SPF CON FECI DI CAMPO CONTENENTI IL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV)

SPF PIG EXPERIMENTAL INFECTION WITH SWINE POSITIVE HEPATITIS E VIRUS (HEV) FAECES

LOMBARDI G., PAVONI E., FAITA R., LOSIO M. N., D'ABROSCA F., LUPPI A., GELMETTI D., CORDIOLI P., BONI P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia

Parole chiave: Epatite E, Suino, nested RT-PCR.
Key words: Hepatitis E, Swine, nested RT-PCR

Riassunto. Il virus dell'epatite E (HEV) è considerato un agente a potenziale carattere zoonosico che ha assunto notevole importanza per la salute pubblica soprattutto nei paesi in via di sviluppo, ma anche, seppure con carattere di sporadicità, nei paesi industrializzati. Il suino è stato identificato come il principale reservoir di HEV e numerosi studi di sieroprevalenza testimoniano un'elevata diffusione del virus all'interno della popolazione suina mondiale.
Nella prima parte del presente lavoro, 183 campioni di feci prelevati in 17 allevamenti suini ubicati in provincia di Brescia, sono stati sottoposti tramite RT-nested PCR all'indagine virologica per HEV. In totale 28 campioni sono risultati positivi per HEV ed il sequenziamento e la successiva analisi filogenetica ha dimostrato l'appartenenza al genotipo 3 di tutti i ceppi sequenziati.
Nella seconda parte di questo studio, impiegando un campione di feci scelto tra i 28 campioni positivi sopraccitati, è stata eseguita un'infezione sperimentale in suini SPF del Centro Allevamento Sperimentazione Animale dell'IZSLER. Il disegno sperimentale ha previsto l'impiego di 10 suini SPF sierologicamente e virologicamente negativi per HEV, di cui quattro infettati sperimentalmente per *os* con le feci sopraccitate, altri quattro posti a contatto con quelli infettati sperimentalmente e gli ultimi due mantenuti separati ed impiegati come controlli negativi.
Ogni giorno sono state prelevate le feci e settimanalmente il sangue da ciascun animale, per la ricerca dell'RNA virale tramite RT-nested PCR. Sugli stessi prelievi di sangue è stata eseguita la determinazione degli anticorpi nei confronti di HEV.

Abstract. Hepatitis E virus has recently been recognized as having zoonotic potential and could be transmitted from pig to human. Pigs are identified as a potential animal reservoir and HEV is highly prevalent in the swine population around the world. In this study the presence of HEV was investigated in 17 pig farms of Northern Italy (Lombardy), by RT-nested PCR on fresh stool samples. For the study 183 stool samples were collected and 28 samples resulted positive to HEV. RT-nested PCR and genotyping demonstrated that all viruses were closely related to different strains pre-

viously described and grouped into the genotype 3.
In the second part of this study, Rt-nested PCR positive feces were used to prepare the HEV inoculum for the oral experimental infections of four HEV-seronegative, three months SPF pigs. Other four, uninoculated pigs were housed in the same pen containing the four inoculated pigs previously described. Two pigs, who were not inoculated, served as negative control. The experimental design consisted of four oral inoculated pigs, four uninoculated pigs used as direct-contact controls and two uninoculated pigs used as negative control and housed separately. Daily fecal swab and weekly blood sample, from each pig, were tested for HEV RNA and anti-HEV antibodies respectively.

Premesse

Il virus dell'epatite E (HEV), appartiene alla famiglia delle *Hepeviridae*, genere Hepevirus, è privo di envelope, presenta un genoma ad RNA positivo a singolo filamento di circa 7,5 Kb ed è causa di epatiti nell'uomo, nei primati e nel suino. Nonostante se ne conosca un solo sierotipo, il virus dell'epatite E viene suddiviso in almeno 4 principali genotipi: il genotipo 1 (che comprende i ceppi asiatici), il genotipo 2 (un solo ceppo messicano), il genotipo 3 (ceppi provenienti dai paesi industrializzati) ed il genotipo 4 (casi sporadici in Cina, Giappone e Taiwan) (1). Nell'uomo HEV è trasmesso principalmente per via oro-fecale soprattutto in seguito al consumo di acqua contaminata, raramente dopo il contatto persona-persona, ed è causa di una sindrome caratterizzata da malessere generale, nausea e vomito.
Il tasso di mortalità è generalmente basso (< 1%), ma nelle donne in gravidanza sono stati osservati casi gravi di epatite con un tasso di mortalità che può raggiungere il 20-25% (3). Epidemie scatenate da HEV sono state descritte in molte parti del mondo tra cui Messico, Asia ed Africa, mentre nel Nord America ed in Europa sono stati osservati casi sporadici, soprattutto in turisti che avevano viaggiato in aree dove la malattia è endemica (7). I ceppi di HEV di tipo suino ed umano isolati nei paesi industrializzati sono filogeneticamente correlati fra loro e sono raggruppati nei genotipi 3 e 4, avvalorando l'ipotesi che HEV sia un virus zoonosico (6).
Le modalità di contagio riconoscono principalmente la via oro-fecale e la trasmissione è più efficace in animali posti a stretto contatto, anche se l'impiego della via orale per l'infezione sperimentale in questa specie si è dimostrata poco efficace, come descritto in letteratura (4). L'eliminazione del virus avverrebbe inoltre attraverso la saliva, l'urina e le secrezioni nasali. Si ipotizza che una volta penetrato per via orale e prima d'indurre viremia, il virus replichi nell'intestino. Successivamente raggiungerebbe il fegato tramite la vena porta, replicherebbe negli epatociti per essere in seguito rilasciato nella bile e nel sangue.
Nella prima parte di questo lavoro si riportano i risultati del monitoraggio virologico eseguito nel 2006, e relativo alla circolazione di HEV in allevamenti suini della provincia di Brescia. Nella seconda parte viene invece descritta l'infezione sperimentale in suinetti SPF di 3 mesi di vita, con un ceppo di campo correlato al ceppo europeo di

HEV suino denominato BCN12, caratterizzato nei laboratori dell'IZSLER durante il monitoraggio virologico sopraccitato (5).

Materiali e metodi

Campionamento
Nel periodo Marzo-Novembre 2006, nell'ambito di un monitoraggio virologico eseguito in 17 allevamenti situati in provincia Brescia (Fig.1) (7 a ciclo aperto, 5 ciclo chiuso e 5 ingrassi), con consistenze variabili da 400 a 4500 animali, sono stati testati 183 campioni di feci, prelevati in modo casuale, in box contenenti 20-25 animali di 2-4 mesi d'età.

Fig.1. Ubicazione degli allevamenti oggetto dello studio.
Fig. 1*. Swine herds involved in the study.*

Indagine virologica e sequenziamento
I campioni di feci sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA attraverso l'impiego di un kit di estrazione del commercio (Nucleospin RNA II kit, Macherey Nagel-Germany). Dopo la retrotrascrizione, eseguita con l'impiego di random primers, è stata condotta una Rt-Nested PCR secondo il protocollo descritto da Erker et al nel 1999, impiegando primers degenerati in grado di amplificare una regione conservata dell'ORF2, comune a tutti i ceppi di HEV .
Tutti i virus riscontrati nelle feci sottoposte ad indagine per HEV, sono stati sequenziati direttamente dal prodotto PCR dopo purificazione (Qiaquik Gel extraction kit – QIAGEN) con il metodo della incorporazione di terminatori desossinucleotidici fluorescenti (BigDye Terminator kit, Applied Biosystem), impiegando gli stessi primers utilizzati nell'amplificazione e sottoposti ad elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Le sequenze sono state analizzate in BLAST

ed allineate utilizzando il metodo CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'analisi filogenetica, rispetto ad altri ceppi di HEV, le cui sequenze sono presenti in GeneBank ed i cui numeri d'accesso sono disponibili presso gli autori, è stata eseguita mediante il software MEGA 3.1, con il metodo della massima parsimonia.

Disegno sperimentale
La sperimentazione ha previsto l'impiego di 10 suinetti SPF di tre mesi di vita (25 kg circa), svezzati fra il 31° ed il 37° giorno. Quattro animali (1÷4) sono stati infettati per via orale con feci di suino positive per HEV, scelte tra quelle risultate positive al monitoraggio virologico precedentemente descritto. Altri quattro suini (5÷8) sono stati posti a contatto con i precedenti il giorno stesso dell'infezione, mentre due suini (9-10) sono stati impiegati come controlli negativi e mantenuti in box separato.
Una settimana prima dell'inizio della sperimentazione, tutti gli animali sono stati testati, con esito negativo, per la determinazione di anticorpi anti-HEV e tramite RT-PCR sulle feci, per verificare la negatività ad HEV.
Il disegno sperimentale ha previsto la somministrazione per via orale di 20 grammi di feci di campo ai suini dal n°1 al n° 4, contenenti il ceppo di HEV correlato a BCN12. Le feci, diluite con soluzione fisiologica fino al raggiungimento di 50 ml, sono state somministrate agli animali in contenzione forzata con l'ausilio di una siringa in un'unica soluzione. Lo stesso giorno in cui è stata eseguita l'infezione sono stati posti nel medesimo box altri 4 suini SPF. Quotidianamente gli animali sono stati sottoposti a visita clinica e contestualmente a questa sono stati eseguiti i tamponi rettali su tutti gli animali a partire dal 1° gpi (1 g di materiale), mentre i prelievi ematici sono stati effettuati con una cadenza settimanale impiegando provette con e senza anticoagulante (4 ml in eparina, 4 ml in EDTA e 4 ml senza anticoagulanti). Per la determinazione degli anticorpi anti-HEV è stato utilizzato un test ELISA di tipo indiretto del commercio (HEV ab, *Nuclear Laser Medicine srl, Italy*) messo a punto per la diagnosi sierologia di epatite E nell'uomo. Il test ELISA impiegato è stato opportunamente modificato, utilizzando un anticorpo policlonale di capra anti IgG di suino del commercio, marcato con perossidasi.
A 25 gpi è stato sacrificato il suino N°1, e ogni 7 giorni gli altri, fino al 90° gpi. I campioni di fegato, linfonodi e intestino, prelevati durante l'esecuzione dell'esame necroscopico, sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati al microtomo, colorati con ematossilina-eosina ed esaminati al microscopio ottico. I campioni tessutali sopraccitati e le feci, il sangue e la bile sono stati inoltre esaminati tramite RT-nested PCR con le modalità già descritte precedentemente (3).

Risultati

Monitoraggio virologico
L'indagine virologica eseguita tramite RT-nested PCR, in 17 aziende suine della provincia di Brescia, ha permesso di evidenziare 28 campioni di feci, su 183 esaminati (15,3%), positivi per la presenza di HEV.

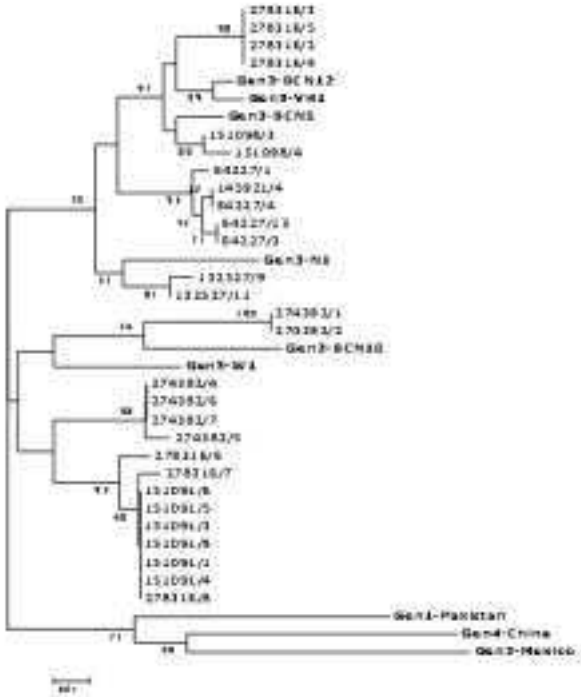


Fig. 2. Albero filogenetico basato sulla sequenza di ORF2, di 28 ceppi di di HEV di campo, riscontrati in feci di suino nel 2006. Genotipo 1-Pakistan (Numero di accesso in Gene Bank M80581), Genotipo 2-Messico (M74506), Genotipo 3-BCN5 (AF490986), -BCN10 (AF490991), -BCN12 (AF490993), -N1(AF490999), -VH1(AF491000), -W1(AF490998) e Genotipo 4-China (AJ272108).
Fig. 2. *Phylogenetic tree of 28 Italian HEV field isolates during 2006 based on ORF2 sequence. Genotype 1-Pakistan (Gene Bank accession no: M80581), Genotype 2-Mexico (M74506), Genotype 3-BCN5 (AF490986), -BCN10 (AF490991), -BCN12 (AF490993), -N1(AF490999), -VH1(AF491000), -W1(AF490998) and Genotype 4-China (AJ272108) reference strains are also considered.*

L'analisi filogenetica ha permesso di classificare questi virus in 6 differenti ceppi, tutti appartenenti al genotipo 3.
I campioni positivi sono stati evidenziati in 3 dei 7 allevamenti a ciclo aperto, in 2 dei 5 allevamenti a ciclo chiuso ed in tutti 5 gli allevamenti da ingrasso oggetto dello studio.

Prova sperimentale
Gli animali sperimentalmente infettati e quelli posti a contatto non hanno presentato sintomatologia clinica, ed all'esame anatomopatologico non sono state osservate lesioni macroscopiche di rilievo. L'esame istologico ha evidenziato, negli otto animali infettatisi, quadri di epatite linfocitaria con presenza di rari epatociti necrotici e sinusoidi dilatati. Nessuna lesione istologica epatica è stata rilevata nei due controlli negativi.

I risultati della Rt-nested PCR, riassunti nella tabella 1, evidenziano come tutti gli animali oggetto della sperimentazione si siano infettati ed abbiano eliminato il virus con le feci.

Tab. 1. Risultati della Rt-nested PCR su feci, sangue, bile, fegato e duodeno.
Tab. 1. *Fecal, blood, bile, liver and duodenum Rt-nested PCR results.*

		Positività alla RT-nested PCR per HEV / gpi				
Suino	Abbattimento	Feci	Sangue	Bile	Fegato	Duodeno
1 (n°1460)	(25°gpi)	dal 1° al 22°	15° e 18°	25°	25° -	
2 (n°1447)	(69°gpi)	dal 1° al 64°	-	-	-	-
3 (n°1437)	(27° gpi)	dal 1° al 25°	-	27°	-	-
4 (n°1446)	(41°gpi)	dal 1° al 33°	-	-	-	-
5* (n°1442)	(48°gpi)	dal 15° al 48°	36°	-	-	48°
6* (n°1499)	(34°gpi)	dal 11° al 20°	-	-	-	-
7* (n°1448)	(67°gpi)	dal 12° al 54°	-	-	-	-
8* (n°1449)	(62°gpi)	dal 19° al 32°	-	-	-	-

* Suini posti a contatto con quelli sperimentalmente infettati.

Il successo dell'infezione sperimentale è stato confermato anche dai risultati dell'indagine sierologica, che mostra come i quattro suini infettati sperimentalmente, sacrificati 25, 27, 41 e 69 gpi abbiano tutti sieroconvertito tra il 18° e il 25° gpi (Fig. 3). Per quanto riguarda i risultati dell'indagine sierologica nei 4 suini posti a contatto, sacrificati a 34, 48, 62 e 67 gpi, la sieroconversione è avvenuta tra il 22° e 28° giorno post-contatto (Fig. 4).
Nei grafici seguenti è possibile valutare l'andamento anticorpale degli animali oggetto della sperimentazione dal momento dell'infezione sino all'abbattimento.

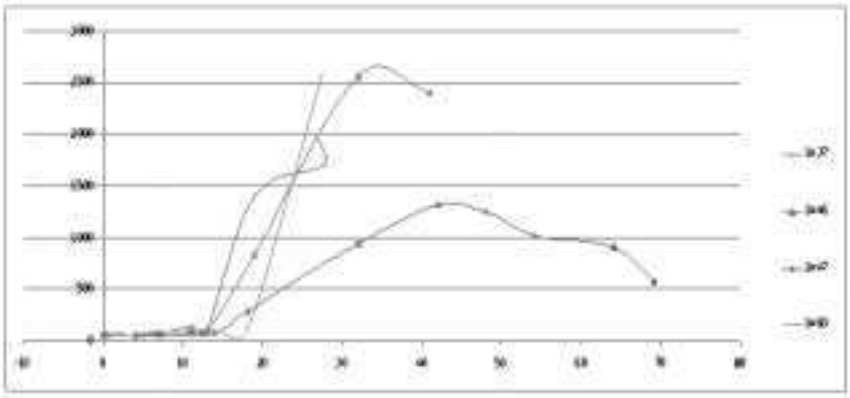


Fig. 3. Andamento anticorpale nei suini infettati sperimentalmente, dal momento dell'infezione all'abbattimento.
Fig. 3. *Serologic profile in experimental infected pig, from the infection to euthanasia.*

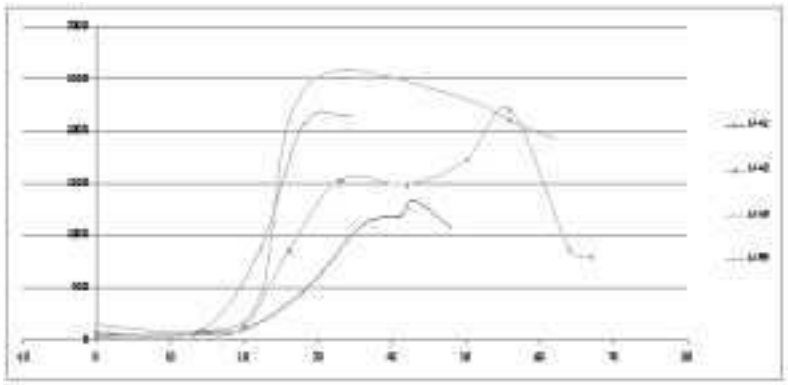


Fig. 4. Andamento anticorpale nei suini posti a contatto dal momento dell'infezione all'abbattimento.
Fig. 4. *Serologic profile of swine housed in direct contact with swine experimental infected, from the infection to euthanasia.*

Discussione e conclusione

La prima parte del lavoro ha dimostrato la circolazione di HEV fra i suini di aziende ubicate in un'area di 243 km^2 della provincia di Brescia, caratterizzata da un'elevata concentrazione di animali. Dai risultati ottenuti appare evidente la contemporanea presenza di aziende positive e negative ubicate nella stessa area geografica. Il numero di aziende testate, relativamente esiguo, non permette conclusioni sull'influenza della tipologia dell'allevamento sull'incidenza dell'infezione da HEV nel suino, tuttavia ulteriori indagini potrebbero fornire maggiori informazioni in questo senso. I risultati del sequenziamento hanno dimostrato come tutti i ceppi appartengano al genotipo 3 e presentino un'elevata omologia con i virus Europei BCN12, W1, BCN5, BCN10, VH1 ed N1, precedentemente descritti in Spagna. Questi risultati, pur interessando una zona relativamente limitata, pongono l'interrogativo sulla reale diffusione del virus all'interno dell'allevamento suino in Italia e pertanto risulta di estremo interesse approfondire indagini di questo tipo in differenti aree geografiche, dove gli allevamenti suini presentano alta densità, andando inoltre ad eseguire studi di sieroprevalenza.
Nella seconda parte del lavoro, come accennato in precedenza, è stata valutata l'infettività di un ceppo di campo, al fine di verificare l'efficacia della trasmissione del virus per via orale e la possibilità d'infezione di altri suini posti a contatto con quelli infettati.
I dati ottenuti nel presente lavoro dimostrano il successo della trasmissione oro-fecale, sia nei suini infettati sperimentalmente sia in quelli posti a contatto. Questi risultati concordano solo in parte con quanto descritto in letteratura, dove viene riportato che l'infezione per via orale risulta difficile da riprodurre ed è possibile solo dopo esposizioni ripetute al virus. Solo nel 2004 è stata descritta per la prima volta un'infezione sperimentale per via orale con esito positivo (4).
La positività delle feci dei suini infettati nei primi 2 giorni post-infezione, sono riconducibili all'evacuazione della matrice somministrata, tuttavia, il riscontro dell'RNA

virale nelle feci, per l'intero periodo della prova, dimostra come il virus replichi precocemente nell'intestino e prima d'indurre viremia.
La viremia non è stata dimostrata in tutti gli animali, sebbene questi abbiano tutti eliminato il virus attraverso le feci e tutti abbiano sieroconvertito. Dall'analisi dei risultati dell'indagine sierologica si può osservare come la sieroconversione sia avvenuta generalmente dopo circa tre settimane dalla data dell'infezione, per gli animali infettati sperimentalmente e dopo quattro settimane per i suini posti a contatto, confermando l'avvenuta infezione ed il successivo coinvolgimento sistemico. Il rilievo dell'RNA virale a livello ematico in solo due degli otto suini infettati sperimentalmente o esposti al virus, potrebbe essere dovuta alla breve durata della viremia stessa, che comparirebbe 5-14 giorni post-infezione e si protrarrebbe per 1-2 settimane, anche con fasi di intermittenza (6). Questo andamento della fase viremica, unitamente all'esecuzione dei prelievi ematici, che come accennato precedentemente hanno avuto frequenza settimanale, potrebbe aver determinato questo risultato.
Attualmente le indagini sono rivolte allo sviluppo di anticorpi monoclonali, per la messa a punto di un kit ELISA, da impiegare nell'esecuzione di indagini sierologiche che forniscano informazioni sulla sieroprevalenza dell'epatite E nel suino, sino ad ora del tutto carenti nel nostro Paese.

Bibliografia

Cooper K., Huang F. F., Batista L., Rayo C. D., Bezanilla J. C., Toth T.E., Meng X. J. Identification of Genotype 3 Hepatitis E virus (HEV) in serum and faecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where Genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. Journal of Clinical Microbiology. 2005, p. 1684-1688.

T.E., Meng X. J. (2005). Identification of Genotype 3 Hepatitis E virus (HEV) in serum and faecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where Genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. Journal of Clinical Microbiology., p. 1684-1688.

Erker J.C., Desai S.M., Mushahawar I.K. (1999). Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. J. Virol. Methods. 81, 1-2, 109-113.

Jaiswal S. P., Jain A. K., Naik G., Soni N., Chitnis D. S. (2001).Viral hepatitis during pregnancy. Int. J. Gynaecol. Obstet. 72: 103-108.

Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G.. (2004). Route of Transmission of Swine Hepatitis e in Pigs. Journal of Clinical Virolgy. 5047-5052.

Lombardi G., Losio N., Torcoli G., Boni P., Barbieri I., Pavoni E., Lavazza A., Cardeti G., Luppi A., Cordioli P. (2006). Molecular identification of hepatitis E virus (HEV) in swine faeces and experimental infection in SPF pigs. Proceeding ESVV – 7° International Congress of Veterinary Virology – 24th – 27th September 2006, Lisboa – Portugal. 203.

Meng X.J., Halbur P. G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H., Emerson S.U. (1998). Genetic and experimental evidence for cross –species infection by swine hepatitis E virus. J Virol. 9714-9721.

Van Cuyck H., Fan J., Robertson D. L., Roques P. (2005) Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. Journal of Virology. 9306-9314.

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI PORCINE TESCHOVIRUS E ENTEROVIRUS TRAMITE RT-PCR

MOLECULAR IDENTIFICATION OF PORCINE TESCHOVIRUS AND ENTEROVIRUS BY RT-PCR

SOZZI E., LUPPI A., LELLI D., MORENO A., CANELLI E., CORDIOLI P., BROCCHI E., BUGNETTI M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: porcine teschovirus e enterovirus, RT-PCR, identificazione molecolare
Key words: porcine teschovirus and enterovirus, RT-PCR, molecular identification

Riassunto. Porcine enterovirus (PEV) e teschovirus (PTV), classificati nella famiglia delle Picornaviridae, sono agenti ubiquitari responsabili per la maggior parte di infezioni asintomatiche, ma in alcuni casi si osservano polioencefalomieliti, turbe riproduttive nella scrofa, patologie enteriche e polmoniti. In questo lavoro sono stati identificati, tramite RT-PCR, 24 ceppi di entero-teschovirus isolati in Italia nel periodo compreso tra il 2006 e il 2007. La metodica si è rilevata un utile strumento diagnostico per l'identificazione molecolare di ceppi di teschovirus/enterovirus e per approntare studi di tipo molecolare sull'epidemiologia e sull'evoluzione di questi virus.

Abstract. Porcine enterovirus (PEV) and teschovirus (PTV), belonging to the family Picornaviridae, are ubiquitous and although the majority of infections are asymptomatic, they were related to polioencephalomyelitis, female reproductive disorders, enteric disease and pneumonia. In the present study a total of 24 Italian porcine entero-teschovirus isolates were analysed by polymerase chain reaction. The assay turned out to be a useful diagnostic tool for molecular identification of porcine teschovirus/enterovirus strains and for the study of molecular epidemiology and evolution of these viruses.

Premesse

L'attività di sorveglianza della Malattia Vescicolare nel suino prevede che siano disposti, accanto ai prelievi di campioni di sangue in allevamento, quelli di feci nelle stalle di sosta e da mezzi di trasporto di partite di suini provenienti dagli Stati membri. Nel caso di più positività su campioni sierologici, i prelievi di feci vengono eseguiti dalle diverse strutture dell'azienda ed a campione dai soggetti sieropositivi. Questi campioni, conferiti presso il Centro per lo Studio e la Diagnosi delle Malattie Vescicolari (CERVES), dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell Lombardia e dell'Emilia Romagna, sono testati tramite una metodica di RT-PCR per la rilevazione del genoma

del virus della MVS ed i positivi esaminati in colture cellulari di rene suino (IB-RS2) per l'isolamento virale. Tra i campioni esaminati in coltura cellulare una percentuale variabile tra il 20 ed il 30% determina un effetto citopatico riferibile a enterovirus, ma con esito negativo all'identificazione antigenica del virus della Malattia Vescicolare, eseguita tramite una metodica ELISA. Altri picornavirus che infettano il suino, inducono un effetto citopatico simile e, recentemente, sono stati classificati come porcine enteric picornaviruses (10).

Porcine enteroviruses (PEVs) sono agenti ubiquitari responsabili di infezioni nella popolazione suina di tutto il mondo. Classificati nella famiglia delle *Picornaviridae*, comprendono, in base ai risultati ottenuti in virus neutralizzazione, 13 sierotipi, tutti precedentemente ascritti al genere enterovirus (18).

Sebbene la maggior parte delle infezioni sostenute da PEVs siano asintomatiche, ceppi virulenti sono responsabili di sindromi cliniche di una certa rilevanza economica, che includono polioencefalomielite, disordini riproduttivi nella scrofa (4), patologie enteriche (7), polmoniti (14) e dermatiti (9). Virus appartenenti ai sierotipi 1, 3, 6 e 8 sono stati isolati in casi associati alla sindrome SMEDI (3).

La forma encefalomielitica sostenuta da porcine enterovirus sierotipo 1 (PEV-1) denominata Teschen disease è stata descritta per la prima volta in Cecoslovacchia nel 1929. Durante gli anni '40 e '50 PEV-1 è stato responsabile di epidemie, che hanno determinato elevate perdite economiche in molti Paesi europei. Successivamente, le forme cliniche gravi sono diminuite nel tempo e il ceppo Teschen ad elevata virulenza è stato gradualmente sostituito dal ceppo Talfan a virulenza minore (5). Negli stessi anni, l'infezione si è diffusa anche in altri continenti ed, accanto ai ceppi appartenenti al sierotipo 1, sono stati individuati altri sierotipi responsabili di forme cliniche diverse ed a patogenicità intermedia (Tab. 1).

Tab. 1. Sindromi cliniche naturalmente o sperimentalmente associate con infezioni da picornavirus enterici suini (10)
Tab. 1. *Natural or experimental clinical sindrome associated with porcine enteric picornavirus infection*

Sindrome	PTV sierotipo	PEV sierotipo
Polioencefalomielite	PTV-1, PTV-2, PTV-3, PTV-5	-
Disordini riproduttivi	PTV-1, PTV-3, PTV-6	PEV-8
Diarrea	PTV-1, PTV-2, PTV-3, PTV-5	PEV-8
Polmonite	PTV-1, PTV-2, PTV-3	PEV-8
Pericardite e miocardite	PTV-2, PTV-3	-
Lesioni cutanee	-	PEV-9, PEV-10

Attualmente la forma clinica encefalitogena è poco frequente e le indagini sierologiche indicano che nella popolazione suina circolano varianti a patogenicità bassa o nulla: PEV-1 è frequentemente isolato da feci, tonsille e altri organi "non – nervosi" di suini apparentemente sani, mentre con maggiore frequenza altri sierotipi sono stati identificati come causa di disordini neurologici (1).

Le proprietà fisico-chimiche degli enterovirus suini sono analoghe a quelle degli stessi virus tipici di altre specie domestiche: i virioni sono sferici di diametro di 25-30 nm,

non possiedono envelope e contengono un core di RNA monocatenario, ricoperto da un capside cubico. Sono moderatamente resistenti nell'ambiente, ai solventi dei grassi, ai comuni disinfettanti ed a pH compresi tra 2 e 9. Gli enterovirus sono facilmente coltivabili su cellule di origine suina, sia su cellule renali primarie (RS) o secondarie (PK15) sia su linee stabilizzate (IB-RS2) e tipizzati in virus neutralizzazione, impiegando sieri iperimmuni sierotipo-specifico. Tuttavia, non sono infrequenti le cross-reazioni tra diversi sierotipi (1), che in base alle proprietà fisico-chimiche, alle proprietà replicative in coltura cellulare e all'effetto citopatico (CPE) sono divisi in tre gruppi: il CPE gruppo I comprende i sierotipi da 1 a 7 e da 11 a 13, il CPE gruppo II il sierotipo 8 ed il CPE gruppo III i sierotipi 9 e 10.
Le difficoltà nel correlare la virulenza con il sierotipo/CPE-gruppo ha indotto i ricercatori, negli ultimi anni, ad approntare studi di tipo molecolare ed a ridefinire la classificazione in base alle caratteristiche genomiche virali.

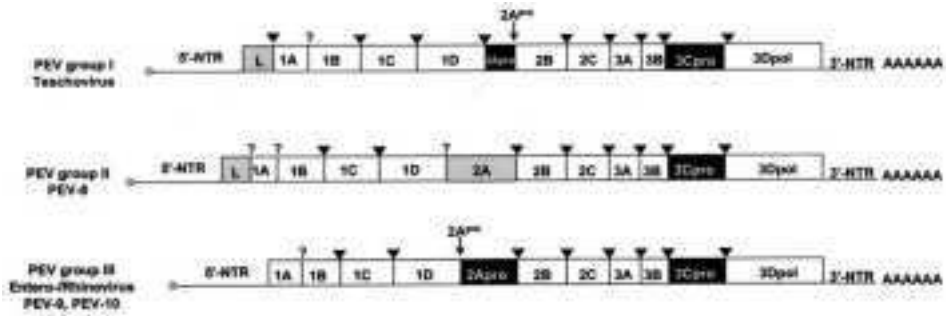


Fig. 1. Organizzazione genomica dei tre gruppi di PEV
Fig. I. *Genome organization of the three PEV groups*

Tramite l'analisi comparativa delle sequenze genomiche dei ceppi prototipo di tutti i sierotipi di PEVs sono stati individuati 3 gruppi distinti (Fig.1): i sierotipi da 1 a 7 e da 11 a 13 di PEV (I CPE-gruppo) costituiscono un unico cluster genetico, diverso rispetto a PEV-8, PEV-9 e PEV-10 e agli enterovirus umani e bovini (8). E' stato, quindi, designato un nuovo genere, *teschovirus*, che comprende una singola specie, *porcine teschovirus* (PTV), ed i sierotipi rinominati teschovirus suini, sierotipo da 1 a 10 (17). In aggiunta a questi è stato identificato un nuovo sierotipo, PTV-11 (18). I rimanenti sierotipi di enterovirus suino sono stati classificati in due specie, p*orcine enterovirus A* (PEV-8, II CPE-gruppo) e *porcine enterovirus B* (PEV-9 e PEV-10, III CPE-gruppo), nel genere *enterovirus* (12). PEV-9 e PEV-10 sono enterovirus strettamente correlati con enterovirus bovino, mentre la posizione tassonomica di PEV-8, ad oggi, è ancora discussa (Fig. 2).

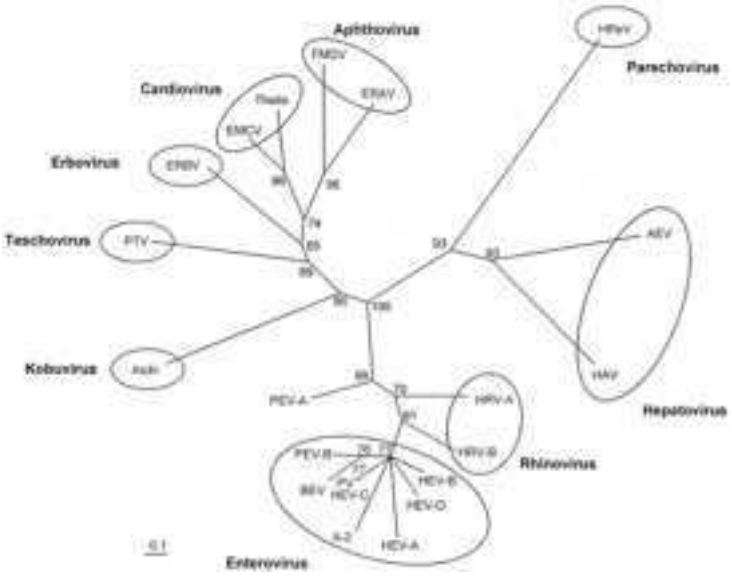


Fig. 2. Albero filogenetico che descrive le relazioni tra 21 specie di picornavirus in base al sequenziamento nucleotidico della polimerasi 3D (Zell et al., 2001)
Fig. 2. *Phylogenetic tree showing the relationships between the 3D polymerases of 21 picornavirus species*

I ceppi PTV-1 associati con la malattia di Teschen classica sono presenti in Europa centrale ed Africa, ma non sono mai stati isolati in Nord America. I ceppi a minor virulenza e quelli rappresentativi degli altri sierotipi di PTV sono ubiquitari, così come PEV-8. Al contrario, PEV-9 e PEV-10 sono stati isolati in Italia, Inghilterra e Giappone (2, 6, 11).
In questo lavoro è stata condotta la caratterizzazione, tramite RT-PCR, di 24 ceppi virali, isolati in Italia, nel periodo compreso tra il 2006 e il 2007.

Materiali e metodi

Campionamento. Presso il CERVES, nel periodo 2006-2007, nel corso della normale attività di campionamento per la ricerca del virus della Malattia Vescicolare, sono stati analizzati in coltura cellulare di IB-RS2 302 campioni di feci di suini, provenienti da diverse regioni italiane e sono stati isolati 92 virus inducenti effetto citopatico riferibile a enterovirus, ma negativi SVDV. Tra gli isolati sono stati selezionati per la caratterizzazione molecolare 24 ceppi.
Virus. I ceppi di entero/teschovirus sono stati propagati su monostrato confluente di una linea cellulare di rene suino (PSEK). Dopo una fase di adsorbimento per un'ora a 37°C, le colture cellulari sono state incubate in terreno MEM di mantenimento antibiotato e addizionato con l'1% di siero fetale bovino fino alla manifestazione dell'effetto

citopatico, generalmente visibile in un periodo di tempo variabile tra 18 ore e 4 giorni post-infezione. Dopo un ciclo di gelo/scongelo e successiva centrifugazione a 2500 X g per 10 min a 4°C, il sovranatante è stato aliquotato e stoccato a -70°C.
Identificazione molecolare. Per l'identificazione molecolare di porcine teschovirus e porcine enterovirus A e B sono state impiegate due differenti RT-PCR (13) e che utilizzano primers che amplificano un frammento della regione altamente conservata 5'-NTR (Tab. 2).

Tab. 2. Primers impiegati in questo studio e dimensione dell'amplificato
Tab. 2. *Primers used in this study and size of expected product*

PRIMERS	LOCATION	SEQUENCE	AMPLICON	REFERENCE
38-F	5'-UTR	TTGAGGATCCTCCGGCCCCTGAATGCG	180 bp PEV-B	Muscillo et al. (1997)
37-R		ATCTAAGCTTGTCACCATAAGCAGCCA		
1222-F	5'-UTR	GTGGCGACAGGGTACAGAAGAG	194 bp PEV-A	Palmquist
1223-R		GGCCAGCCGCGACCCTGTCAG	169 bp PTV	et al. (2002)

I ceppi PEV-B (sierotipo 9 e 10) sono stati identificati attraverso l'impiego di primers che amplificano un frammento di 180 bp della regione 5'-NTR di enterovirus (15), mentre i virus PEV-A e PTV sono stati determinati con l'impiego di un medesimo set di primers che riconosce una porzione della regione 5'-NTR e sono differenziati in base alla dimensione del prodotto amplificato (194 bp per PEV-A e 169 bp per PTVs), come descritto da Palmquist et al. (16) (Fig. 3).

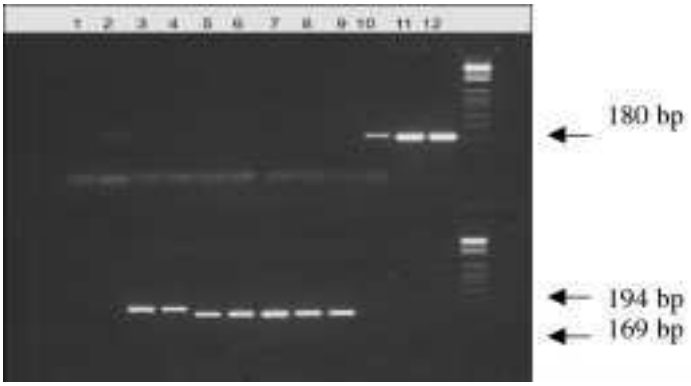


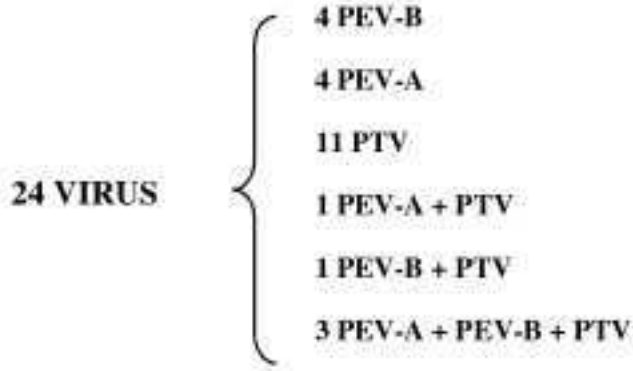
Fig. 3. Identificazione di sequenze specifiche di PEV-B, PEV-A e PTV in ceppi di campo: il frammento di 180 bp è amplificato a partire da RNA di PEVs-B e i frammenti di 194 bp e 169 bp sono amplificati a partire rispettivamente da RNA di PEVs-A e PTVs
Fig. 3. *Detection of PEV-B, PEV-A e PTV specific sequences in field strains: characteristic fragment of 180 bp was amplified when using RNA of PEV-B and the fragments of 194 bp and 163 bp are amplified when using RNA of PEVs-A and PTVs*

L'RNA virale è stato estratto partendo da 200 µl di sovranatante delle colture cellulari, impiegando un protocollo, che prevede l'uso di Trizol, modificato rispetto al metodo proposto da Chomczynsky e Sacchi (1987). L'RNA è stato retrotrascritto ed amplificato utilizzando un kit one-step del commercio (One Step Rt PCR kit – Qiagen). La reazione di retrotrascrizione e di amplificazione è stata condotta in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), secondo il seguente profilo termico per entrambe le RT-PCR: 45 minuti a 42°C, un ciclo di denaturazione 2 minuti a 95°C, 1 minuto a 51°C di annealing, 1 minuto a 72°C di estensione, 35 cicli costituiti da 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 51°C e 1 minuto a 72°C ed un'estensione finale di 10 minuti a 72°C. Gli amplificati sono stati analizzati su gel di agarosio all'2.5% per valutare la presenza delle bande attese.

Risultati

Tramite le metodiche RT-PCR descritte, tutti i ceppi virali isolati nel periodo 2006-2007 sono stati identificati ed i risultati sono illustrati nella tabella 3.

Tab. 3. Risultati dell'identificazione molecolare tramite RT-PCR
Tab. 3. *Results of molecular identification by RT-PCR*



Durante il periodo di studio, PTVs sono stati identificati nel 45,8% (11/24) dei campioni suini analizzati, PEV-A nel 16.6% (4/24) così come PEV-B nel 16.6% (4/24), mentre il 12.5% (3/24) degli isolati sono risultati includere ambedue le specie enterovirus (PEV-A e PEV-B) e teschovirus, il 4.6% (1/24) PEV-A e PTV e ancora il 4.6% (1/24) PEV-B e PTV.

Discussioni e conclusioni

Nel presente lavoro è stata realizzata la caratterizzazione molecolare di ceppi di entero/teschovirus isolati presso il CERVES, durante gli anni 2006 e 2007, da pool di feci

di suini provenienti da diverse regioni italiane e sottoposti a campionamento nell'ambito del Piano di sorveglianza della Malattia Vescicolare del suino.
La caratterizzazione degli enterovirus è stata condotta tramite due metodiche RT-PCR, che impiegano primers, che amplificano frammenti della regione altamente conservata 5'-NTR. In particolare, una prima RT-PCR amplifica un prodotto di 180 bp della 5'-NTR di diverse specie di enterovirus umani e, nei suini, dei PEVs-B (sierotipo 9 e 10) e non dei PEVs-A e PTVs. Questo conferma, come descritto da Zell et al. (20), che i PEV-B sono enterovirus classici, geneticamente simili agli enterovirus umani e bovini, con i quali i virus PEV-A e PTV presentano una minore omologia. Una seconda RT-PCR permette la classificazione dei virus PEV-A e PTV, suddividendoli in due gruppi in base al peso molecolare del prodotto amplificato.
Dei 24 ceppi oggetto dello studio, 4 virus hanno generato un amplificato di 180 bp tramite la RT-PCR enterovirus-specifica e classificati come PEV-B, mentre i ceppi virali non PEV-B sono stati amplificati con la seconda RT-PCR per la identificazione di PTV e PEV-A. 4 virus hanno prodotto un amplificato di 194 bp, tipico dei PEVs-A, sierotipo 8, e da 11 ceppi sono stati ottenuti prodotti di PCR di 169 bp, tipico dei PTVs.
Tra tutti gli isolati, in 3 colture virali sono stati identificati virus diversi appartenenti ad entrambi i generi teschovirus ed enterovirus A e B, in uno PTV e PEV-A, in un altro PTV e PEV-B, ad indicare che le infezioni miste sono abbastanza frequenti nel suino.
Le metodiche di RT-PCR sopraccitate rappresentano un valido iter diagnostico per una rapida diagnosi e tipizzazione di PTVs/PEVs. Dato che le infezioni da entero/teschovirus sono endemiche nel suino ed i virus sono presenti nel tratto enterico in quantità significativa (in circa il 30% dei campioni), l'analisi filogenetica di questi ceppi di campo risulterà, pertanto, un valido supporto per approntare studi epidemiologici ed evolutivi di questi virus.

Lavoro parzialmente finanziato dal Progetto di Ricerca Ministeriale 2002/007.

Bibliografia

Auerbach J., Prager D., Neuhaus S., Loss U. and Witte K.H. (1994) "Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes". Zentralbl Veterinarmed B. 41(4):277-82.

Caracappa S., Vesco G., Iannizzotto G., Guercio V. and Knowles N.J. (1985) "Isolamento ed identificazione di enterovirus suini in Sicilia". Arch. Vet. Ital. 36:167-170.

Doherty M., Todd D., McFerran N. and Hoey E.M. (1999) "Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses". J. Gen. Vir. 80:1929-1941.

Dunne H.W., Gobble J.L., Hokanson J.F., Kradel D.C. and Bubash G.R. (1965) "Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses". Am J Vet Res. 26(115):1284-97.

Harding J.O.J., Done J.T. and Kershaw G.F. (1957) "A transmissible polioencephalomyelitis of pigs (Talfan disease)". Vet. Rec. 69:824-832.

Honda E., Kimata A., Hattori I., Kumagai T., Tsuda T. and Tokui T. (1990) "A serological com-

parison of 4 japanese isolates of porcine enteroviruses with the international reference strains". Jpn. J. Vet. Sci. 52:49-54.

Izawa H., Bankowski R.A. and Howarth J.A. (1962) "Porcine enteroviruses. I. Properties of three isolates from swine with diarrhea and one from apparently normal swine". Am J Vet Res. 23:1131-41.

Kaku Y., Sarai A. and Murakami Y. (2001) "Genetic reclassification of porcine enteroviruses". J Gen Virol. 82(Pt 2):417-24.

Knowles N.J. (1988) "The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue". Vet Rec. 122(18):441-2.

Knowles N.J. (2006) Porcine Enteric Picornaviruses in Diseases of Swine 9TH Edition: 337-345.

Knowles N.J., Buckley L.S. and Pereira H.G. (1979) "Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes". Arch. Virol. 62:201-208.

Krumbholz A., Dauber M., Henke A., Birch-Hirschfeld E., Knowles N.J., Stelzner A. and Zell R. (2002) "Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups". J Virol. 76(11):5813-21.

La Rosa G., Muscillo M., Di Grazia A., Fontana S., Iaconelli M. and Tollis M., (2006) "Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of Porcine Teschoviruses and Enteroviruses". J. Vet. Med. B 53:257-265.

Meyer R.C., Woods G.T. and Simon J. (1966) "Pneumonitis in an enterovirus infection in swine". J Comp Pathol. 76(4):397-405.

Muscillo M., Carducci A., La Rosa G., Cantiani L. and Marianelli C. (1997) "Enteric virus detection in Adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis". Water Res. 31:1980-1984.

Palmquist J.M., Munir S., Taku A., Kapur V. and Goyal S.M. (2002) "Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction". J. Vet. Diagn. Invest. 14:476-480.

Pringle C.R. (1999) "Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology", Sydney, Australia, 1999. Arch. Virol. 144: 2065-2070.

Thoelen I., Moes E., Lemey P., Mostmans S., Wollants E., Lindberg A.M., Vandamme A.M. and Van Ranst M. (2004) "Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species". J. Clin. Microbiol. 42:963-971.

ERADICAZIONE DELLA PRRS IN UN GROSSO ALLEVAMENTO DI SCROFE MEDIANTE L'UTILIZZAZIONE DI "HERD CLOSURE" E "WEAN & REMOVAL"; REAL TIME RT-PCR COME METODO PER RILEVARE BASSI POSITIVI NEL SANGUE?

GIAMPIETRO SANDRI[1], PATRIZIA PESENTE[2], SARA BITTESNIK[2], MAURA FERRARI[3], SANDRA TORRIANI[4], DAVIDE GIOVANARDI[2]

[1]Agricola Tre Valli – Gruppo Veronesi, Quinto di Valpantena, Verona, Italia; [2]Laboratorio Tre Valli – Gruppo Veronesi, S. Martino B.A., Verona, Italia; [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia-Romagna, sede di Brescia, Italia; [4] Dipartimento di Scienze, Tecnologie e Mercati della Vite e del Vino, San Floriano, Verona, Italia.

Parole chiave: Eradicazione della PRRS, "Wean & Removal", Real Time RT-PCR, Infezione persistente, Sierologia.

Riassunto. Per aumentare le chance di successo di un programma di eradicazione della PRRS, in un grosso allevamento di scrofe del nord Italia, è stata utilizzata la strategia dell'"Wean & Removal" assieme all'"Herd Closure". Durante il periodo di campionamento è stato osservato che molte delle scrofe risultavano positive ad una Real Time RT-PCR, mentre erano negative alla sierologia (IDEXX). Due di queste sono state mantenute in isolamento e campionate a diversi intervalli di tempo. Una delle due è stata fatta partorire ed è stata monitorata assieme alla propria covata e a quattro maialini PRRS negativi, che sono stati messi a contatto a metà lattazione. Mentre alcuni dei campioni raccolti erano ancora positivi alla PCR ma non c' è stata sieroconversione. Per testare ulteriormente se questi campioni biologici fossero in grado di infettare altri animali, è stato programmato un test biologico in cui due maialini svezzati sono stati infettati intramuscolo con l'omogeneato di campioni mentre altri due sono stati utilizzati come animali a contatto non infetti. Né i maialini infettati intramuscolo né quelli a contatto hanno sviluppato l'infezione o sieroconvertito. Una parte degli stessi campioni è stata spedita ad un altro laboratorio, il quale ha confermato la presenza di acido nucleico di PRRSV tramite Real time PCR, ma non è riuscito a isolare il virus. Si forniscono considerazioni sull'utilizzo e sui risultati dati da questa tecnica di Real time RT/PCR.

Introduzione

La sindrome riproduttiva respiratoria suina (PRRS) è ancora probabilmente, dal punto di vista economico, la malattia più rilevante nell'industria suinicola a livello mondiale. In accordo con Pesente *et al*., 2006[1], si considera che la variabilità dei ceppi italiani possa essere la causa principale della difficoltà di controllo della malattia in campo. In una grossa scrofaia del nord Italia ("sito 1" dove si produceva l'autorimonta), tra Ottobre 2005 e Gennaio 2006 si è manifestato un grave episodio di PRRS, che ha causato

centinaia di aborti ed elevata mortalità dei suinetti. La diffusione aerea ha provocato anche l'infezione di due allevamenti da ingrasso[2] ad essa adiacenti. La produzione di suinetti ha subito gravi perdite e si è ritornati a livelli normali solo nella tarda primavera del 2006. In quel momento è stato deciso di tentare un programma di eradicazione di PRRS per evitare problemi in futuro.
Inizialmente è stato deciso di utilizzare la tattica dell'"Herd Closure", anche sui due siti da ingrasso adiacenti (che sono stati completamente svuotati) e l'intera rimonta delle scrofette è stata bloccata il 15 Marzo 2006.
Si è dato inizio allo sviluppo di unità esterne per la crescita delle scrofette e contemporaneamente sono iniziati dei centri di allevamento e fecondazione.
Per aumentare le chances di successo nel settembre 2006 è stato anche deciso di usare lo "Wean & Removal"[3] come strumento ulteriore.
In pratica a tutti gli animali dell'allevamento è stato prelevato il sangue a gruppi settimanali, partendo dalla 37^ settimana del 2006 (primi di Settembre 2006) fino alla 13^ settimana del 2007 (alla fine di Marzo 2007). Basandosi sulla combinazione dei risultati del test ELISA per PRRS (IDEXX HerdChek®) e della PCR, le scrofe positive sono state eliminate o prima di partorire (PCR positive) oppure allo svezzamento (sierologia positiva con valore di s/p di 1,3). Per ridurre i tempi e i costi, durante le 29 settimane di campionamento, è stato deciso di analizzare in PCR pool di cinque sieri e per evitare di tralasciare dei positivi si è deciso deliberatamente di usare una tecnica "molto sensibile" quale la Real time RT-PCR (**vedi materiali e metodi a.**) invece della convenzionale One-step RT-PCR. I campioni di sangue (sieri) dei pool risultati positivi in PCR sono stati testati nuovamente in singolo e diversi animali sono risultati positivi in PCR durante il periodo di eradicazione. Tuttavia non è stata trovata nessuna correlazione con alcune particolari categorie di parto, ma si è visto che la maggior parte degli animali positivi alla PCR erano negativi all'ELISA. Inizialmente ciò è stato interpretato come il possibile risultato di una recente infezione; per comprendere meglio si è in seguito deciso di tenere alcune di queste scrofe in isolamento e verificare nel tempo una eventuale sieroconversione.

Materiali e metodi

a) Laboratorio Tre Valli
– *Estrazione di RNA virale*: l'RNA è stato estratto da sieri, da organi e da un controllo positivo, utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germania) in accordo con le istruzioni del produttore e l'estratto è stato infine risospeso in 100 ml di acqua priva di nucleasi.
– *Real time RT-PCR*: gli RNA di tutti i campioni sono stati amplificati con una One-step Real time RT-PCR, come riportato da Revilla-Fernandez *et al.*, 2005[4], per rilevare la presenta del virus PRRS tipo europeo. Un volume di 5 ml di RNA virale è stato aggiunto a 20 ml di reazione, contenente 1X di mix di reazione (Invitrogen Ltd, Paisley, UK), 0,2 mM di primer specifici per l'ORF6 qEU-F (GTA GAA AGT GCT GCA GGT CTC CA) e qEU-R (CAC GAG GCT CCG AAG TCC T), 0,18 µM di TaqMan MGB-probe (6FAM-CTG TGA GAA AGC CCG GAC-NFQ-MGB), 20 U di RNase

Inhibitor (Promega, Madison, WI), 0,5 µl di Rox e 1 ml di Superscript III RT/PCR Taq mix (Invitrogen). Il programma di amplificazione è stato eseguito su 7300 Real Time PCR system (Applera, Calif., USA) come di seguito: un ciclo di 50°C per 30 min e 95°C per 5 min, seguito da 45 cicli a 95°C per 15 s, 55°C per 30 s e 72°C per 1 min. In ogni corsa i campioni sono stati analizzati in doppio e sono stati aggiunti un controllo positivo e due negativi per ogni campione.
– *One-step RT-PCR convenzionale*: è stata utilizzata una One-step RT-PCR convenzionale che permette di amplificare un frammento di 637 bp di ORF 7 di PRRSv, utilizzando i primer P72[5] e Olek-F[6] e il kit "Super Script One-step RT-PCR con platinum Taq" (Invitrogen).

b) Laboratorio IZSLER, sede Brescia
– *Preparazione campioni:* I campioni sono stati omogeneizzati in una soluzione salina arricchita con antibiotico (penicillina 5000 U/ml, streptomicina 1000 µg/ml ed amfotericina B 10 µg/ml). La sospensione di tessuto è stata centrifugata a 5000 rpm/20 min a 4°C e il surnatante è stato prelevato e usato per l'isolamento del virus.
– *Cultura cellulare*: sono state utilizzate la linea cellulare Marc 145, cresciuta in Minimum essential Medium (MEM) arricchito con 10% (v/v) di siero fetale bovino e le linee cellulari primarie di macrofagi alveolari (ottenute da maiali SPF) cresciute su terreno RPMI-1640 arricchito con 20% di siero fetale bovino.
– *Real time RT-PCR*: l'estrazione di RNA, la Reverse transcription (RT) e la Real time PCR sono state effettuate in accordo con Revilla-Rernandez *et al.*, 2005[4] utilizzando Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel) per l'estrazione dell'RNA, gene AMP kit (Applied Biosytems) per la sintesi del cDNA e Real Probe master Mix (Eppendorf) per la PCR. La Real Time PCR per PRRSV è stata eseguita su DNA engine Opticon 2 system (MJ Research).
– *Isolamento virale:* la linea cellulare Marc 145 è stata seminata in due fiasche (25 cm_2) incubate a 37°C in 5% di CO_2. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato eliminato da uno dei due flaconi ed è stato aggiunto 1 ml di sospensione del campione. Nella seconda fiasca, che rappresenta il controllo, il terreno di coltura è stato sostituito con 1 ml di MEM. Le colture sono state incubate a 37°C per 60 minuti e in seguito sono stati aggiunti 9 ml di terreno di mantenimento (MEM arricchito con 2% siero fetale bovino) ad ogni fiasca. A questo punto, sono state incubate per 7 giorni o fino a quando è apparso l'effetto citopatico (CPE). Ad intervalli di 7 giorni sono stati fatti otto passaggi. Le cellule di macrofagi alveolari sono state seminate in piastre da 24 pozzetti e dopo 24 ore di incubazione a 37° C al 5% di CO_2 sono stati aggiunti a 18 pozzetti 100 ml di surnatante del tessuto campionato. Sui rimanenti pozzetti sono stati versati 100 ml di terreno di coltura. La piastra è stata incubata come precedentemente spiegato. Alla fine del periodo di incubazione le cellule MARC 145 infettate e i macrofagi alveolari sono stati congelati ed analizzati per ulteriori passaggi.

Storia delle scrofe n° 16981 e n° 20307
Alle scrofe 16981 (6° parto) e 20307 (3° parto), insieme ad altre 288 scrofe, è stato prelevato il sangue per la prima volta prima di entrare in sala parto il 21 Novembre

2006. I loro valori di s/p erano rispettivamente 0,00 e 0,15 (47 altre scrofe dello stesso gruppo sono state eliminate dopo lo svezzamento perché i loro valori di s/p erano maggiori di 1,3). Nessuno dei 58 pool di sangue testati era positivo in PCR. Alle stesse scrofe è stato fatto un secondo controllo il 26 febbraio 2007, mentre erano in gestazione, poiché i piccoli, nati da questo gruppo di madri, a Dicembre 2006 durante un controllo routine in un post svezzamento, erano risultati positivi al test sierologico per la PRRS). Dei 129 animali testati soltanto queste due scrofe sono risultate positive alla PCR ma ancora negative alla sierologia (s/p 0,00 e 0,11). I due animali sono stati immediatamente rimossi dalle loro gabbie di gestazione e messi assieme in un sito isolato ai margini della scrofaia dove sono state analizzate tre volte durante il mese di Marzo 2007 (13-03; 20-03; 27-03).

Tab. 1. Scrofa n° 16981

Data	Campione	Real Time RT -PCR	Serol. s/p	One-step RT-PCR Convenzionale	Commento
13 Marzo 2007	Siero	Neg.	Neg. 0,00		
	Rasch. tonsillare	Pos			C_T 37
20 Marzo 2007	Siero	Neg.	Neg. 0,00		
	Rasch. tonsillare	Pos.			Pool con 20307 C_T 36
27 Marzo 2007	Siero	Pos.	Neg. 0,00		C_T 39
	Rasch.tonsillare	Pos.		Pos.	C_T 35,4

Tab. 2. Scrofa n° 20307

Data	Campione	Real Time RT -PCR	Serol. s/p	One-step RT-PCR Convenzionale	Commento
13 Marzo 2007	Siero	Neg.	Neg. 0,01		
	Rasch.tonsillare	Neg.			
20 Marzo 2007	Siero	Neg.	Neg. 0,07		
	Rasch.tonsillare	Pos.			Pool con 16981 C_T 36
27 Marzo 2007	Siero	Pos.	Neg. 0,05		C_T 39
	Rasch.tonsillare	Pos.		Pos.	C_T 35

Dopo questi sorprendenti risultati (le due scrofe sono risultate positive in PCR più volte durante il periodo di un mese, ma sempre negative per la sierologia) è stato deciso di sopprimere la scrofa 16981 e spostare la scrofa 20307 in un secondo sito di isolamento (è stata allestita una gabbia per parto in una stanza con pavimento solido e filtrazione dell'aria), dove ha portato a termine la gravidanza e il parto. Dopo l'arrivo (il 6 Aprile 2007) la scrofa è stata analizzata tre volte, a intervalli settimanali, prima del

parto. Ancora una volta sono state rilevate due PCR positive ma tutti i campioni di sangue erano negativi all'analisi sierologica.

Tab. 3. Scrofa n° 20307 prima del parto

Data	Campione	Real Time RT -PCR	Serol. s/p	One-step RT-PCR Convenzionale	Commento
06 Aprile 2007	Siero	Neg.			
	Rasch.tonsillare	Neg.	Neg. 0,02		
13 Aprile 2007	Siero*	Pos.	Neg. 0,01		C_T 38,7
	Rasch.tonsillare	Neg.			
20 Aprile 2007	Siero	Neg.	Neg. 0,05		
	Rasch.tonsillare*	Pos.		Neg.	C_T 36

Infine, il 26 aprile 2007 (un giorno prima della data attesa per il parto) la scrofa 20307 ha partorito naturalmente una figliata di 19 suinetti nati vivi e uno nato morto. Lo stesso giorno alla scrofa è stata effettuato un nuovo prelievo e tutti i campioni (sangue, raschiato tonsillare e colostro) erano PCR negativi (sia con la One-step RT-PCR convenzionale sia con la Real Time RT-PCR) mentre l' s/p ratio dei sieri era di 0,03. Nei giorni successivi la madre e i suinetti sono stati seguiti in accordo a quanto riportato nella tabella sottostante; sono anche stati analizzati il suinetto nato morto e alcuni maialini morti/deboli. È stato trovato un positivo Real Time RT-PCR (ma non in One-step RT-PCR convenzionale) da un pool di polmoni di maialini di 1 giorno d'età.

Tab. 4. Analisi dopo il parto

Data	Giorni post-parto	Identificazione	Real Time RT-PCR	One-step RT-PCR Convenzionale	Commenti
27 Aprile 2007	1	1 nato morto 2 maialini svezzati	Tonsille Neg. Linfonodi Neg. Milza Neg. Polmoni Pos.	neg.	
29 Aprile 2007	3	2 maialini svezzati	Neg.		
02 Maggio 2007	5	1 maialino svezzati + 6 soppressi	Neg.	Pos.	7 suinetti rimasti

Per verificare ulteriormente se la scrofa o la sua covata fossero in grado di infettare per contatto, l'8 maggio (11 giorni dopo il parto) sono stati messi a contatto nella stessa gabbia da parto 4 maialini ("naïve") di 10 giorni d'età (provenienti da un allevamento di scrofe PRRS negativo). Lo stesso giorno, dopo il contatto, la scrofa 20307 è stata analizzata assieme i suoi sette maialini sopravissuti e i quattro "naïve" (A, B, C, D).

Tab. 5. Analisi della scrofa, dei maialini e dei suinetti "naïve"

Data	Giorni post-parto	Identificazione	Real Time RT-PCR	One-step RT-PCR Convenzionale	Commenti
08 Maggio 2007	11	Siero scrofa	* Pos.	Neg	(s/p 0,00)
		Rasch.tonsillare Scrofa	Neg.	Neg.	
		Maialini 1-7 (sieri)	Neg.	Neg.	(s/p 0,08)
		4 maialini "naive" (sieri)	Neg.	Neg.	(s/p 0,02)

Nei giorni successivi (13-14 Maggio; 5 e 6 giorni dopo il contatto) 3 maialini, tra quelli messi a contatto, sono morti perché non riuscivano a nutrirsi correttamente.
I loro organi (linfonodi, polmoni e milze) sono stati raccolti in pool, analizzati mediante Real Time RT-PCR e sono risultati negativi. Nuovamente il 22 Maggio (26° giorno di allattamento-14° giorno di contatto per il maialino D) è stato prelevato il sangue dalla madre e dai maialini; tutti i campioni erano negativi alla Real Time RT-PCR e alla sierologia. Alla fine, il 28 maggio (32° giorno di allattamento; 20° giorno dopo il contatto per il maialino D) a tutti i suinetti rimanenti (1-7 nati dalla scrofa 20307 e il maialino a contatto D) è stato prelevato il sangue e poi sono stati soppressi. Tutti i sieri erano negativi alla sierologia (s/p range 0.02-0.28) e alla Real Time RT-PCR, come pure i pool di organi dei maialini. Due giorni dopo anche la scrofa (il 30 maggio) è stata uccisa. Di seguito sono riportati i risultati dei controlli eseguiti sui campioni biologici ottenuti.

Tab. 6. Analisi degli organi e del siero della scrofa

Data	Campioni	Real Time RT-PCR	One-step RT -PCR Convenzionale	Commenti
30 Maggio 2007	Tonsille	Neg	Neg	
	Fegato	Neg	Neg	
	Linfonodi	Neg	Neg	
	Milza*	Pos.	Pos.	
	Polmoni	Neg	Neg	
	Siero	Neg	Neg	s/p 0,00

I campioni* di tutti gli individui PCR positivi sono stati stoccati a -80°C, per essere usati in una successiva prova biologica, il cui scopo era di verificare se i positivi Real Time RT-PCR fossero in grado di infettare suinetti PRRS negativi.
Un'aliquota degli stessi campioni è stata inviata a un laboratorio esterno (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia-Romagna, sede centrale Brescia) per isolare il virus ed eseguire PCR (**vedi materiali e metodi b.**).

Seconda parte

La seconda parte di questo studio è stata svolta dalla fine di Giugno per tutta la metà di Agosto 2007. Lo scopo era valutare se alcuni dei campioni biologici, risultati positivi alla nostra Real time RT-PCR e congelati, fossero capaci di infettare altri maiali. Quattro lattonzoli di 10 settimane (28 Kg), provenienti da un sito 2 di svezzamento di una scrofaia negativa alla PRRS, sono stati messi in isolamento. All'arrivo (il 26 Giugno 2007) sono stati campionati e sono risultati negativi sia all'ELISA per PRRS con s/p medio di 0.02 sia alla nostra Real Time RT-PCR eseguita su sieri. I quattro animali sono stati accasati insieme in una stanza di isolamento (4 m x 5 m) con pavimento solido e filtrazione dell'aria. Dopo circa 2 settimane, il 12 Luglio 2007, due di questi (maiali A e B) sono stati infettati sperimentalmente e tenendo gli altri due (C e D) nella stessa gabbia/stanza come animali a contatto non infetti. I maiali A e B sono stati infettati intramuscolo con 2 ml di inoculo costituito dal siero di scrofa positivo alla PRRS (*13 aprile 2007) e dal raschiato tonsillare positivo alla PRRS (*20 aprile 2007) diluiti in 1 ml di PBS. I quattro lattonzoli sono stati analizzati giornalmente per valutare i segni clinici ed è stato prelevato il sangue nei giorni 4, 7, 11 e 15 dopo l'infezione. Tutti i sieri prelevati erano negativi alla Real Time RT-PCR e alla sierologia. Il 2 agosto 2007 è stato eseguito un secondo protocollo di infezione utilizzando un omogeneizzato di milza (10 gr. di milza erano stati omogeneizzati e poi diluiti in PBS per un volume finale di 10 ml) che è stato nuovamente iniettato intramuscolo (2 ml a capo) ai maiali A e B mentre i maiali C e D sono rimasti come controlli non infetti. È stato prelevato il sangue ai quattro maiali nei giorni 4, 7, 11 e 15 dopo la seconda infezione. Tutti i sieri sono risultati ancora negativi alla Real time RT-PCR e alla sierologia.

Tab. 7. *Riepilogo della prova biologica*

Evento	Data	Real Time RT-PCR	IDEXX
Arrivo maiali 1° prelievo	26 Giugno	4/4 negativi	4/4 negativi
1ª Infezione 12 Luglio			
2° prelievo di sangue	16 Luglio	4/4 negativi	4/4 negativi
3° prelievo di sangue	19 Luglio	4/4 negativi	4/4 negativi
4° prelievo di sangue	23 Luglio	4/4 negativi	4/4 negativi
5° prelievo di sangue	27 Luglio	4/4 negativi	4/4 negativi
2ª Infezione 02 Agosto			
6° prelievo di sangue	06Agosto	4/4 negativi	4/4 negativi
7° prelievo di sangue	09 Agosto	4/4 negativi	4/4 negativi
8° prelievo di sangue	13 Agosto	4/4 negativi	4/4 negativi
9° prelievo di sangue	17 Agosto	4/4 negativi	4/4 negativi

Risultati IZSLER Brescia

Nei campioni analizzati, mediante RT e Real-Time PCR, si è confermata la presenza di acido nucleico di PRRSV, ma non è mai stato osservato un effetto citopatico sulle cellule infettate. La Real time PCR risultata positiva solo al primo passaggio su cellule di

macrofagi alveolari, mentre nei passaggi successivi non sono state rilevate tracce di acido nucleico di PRRSV.

Discussione

Durante questo studio (92 giorni, dal 27 febbraio 2007 al 30 maggio 2007) la scrofa 20307 è stata analizzata 11 volte a diversi intervalli di tempo. La prima campionatura di sangue della scrofa è risultata positiva per la prima volta con la nostra Real time RT-PCR il 27 febbraio 2007. Da allora abbiamo avuto altre PCR positive da sangue (3 volte), da raschiato tonsillare (3 volte) e infine dalla milza della scrofa uccisa. Tutti i positivi di Real time RT-PCR hanno dato alti valori di C_T ("cycle threshold") tra 35 e 39, il quali indicano un basso contenuto di virus. Solo due volte i campioni sono risultati positivi sia alla nuova Real Time RT-PCR sia al metodo One-step RT-PCR convenzionale. Stranamente l'analisi sulla stessa scrofa, come molte altre durante il periodo di campionamento del programma di eradicazione della PRRS, non ha mai dato origine a sieroconversione con l'IDEXX per la PRRS. Il fatto che la scrofa regolarmente abbia partorito un ampia prole e che nessuno dei 4 suinetti messi a contatto e dei 4 lattonzoli inoculati nella seconda parte dello studio (prova biologica) abbiano sieroconvertito o dato risultati di PCR positivi, è l'indicazione che la nuova tecnica di Real Time RT-PCR è estremamente sensibile e capace di rilevare un bassissimo numero di copie dell'RNA virale, in una situazione in cui la circolazione del virus non è rilevabile. Questo dato è in completo accordo con le conclusioni del laboratorio dell'istituto zooprofilattico di Brescia, per il quale: "*i test di laboratorio sembrano suggerire l'assenza di infettività del virus, come mostrato dall'incapacità del virus di replicare su colture cellulari specifiche e dalla graduale scomparsa dell'acido nucleico già dopo il primo passaggio su cellule*". Simili indicazioni sono già risultate da recenti studi di Wills *et al*., 2003[7], Revilla-Fernandez *et al*., 2005[4] e fa Bonilauri *et al*., 2007[8].

Implicazioni

– Nelle condizioni di questo studio, utilizzando la tecnica di Real Time RT-PCR descritta, abbiamo dimostrato che è possibile rilevare per un periodo di tempo, piuttosto lungo, anche un numero estremamente basso di copie del virus della PRRS in campioni biologici come sangue e raschiato tossilare.
– Gli animali che, come la scrofa 20307, rimangono negativi alla tecnica ELISA per PRRS, possono rappresentare un potenziale rischio per il successo del programma di eradicazione, se non viene eseguito un doppio confronto con un'adeguata (sensibile) tecnica di PCR.
– La Real Time RT-PCR descritta è stata utilizzata ampiamente durante il nostro programma di eradicazione e ha permesso di eliminare animali risultati positivi, anche se queste scrofe, al momento della campionatura, probabilmente rappresentavano un rischio minimo per la trasmissione/eliminazione di virus della PRRS.

– L'uso di una tecnica di PCR così sensibile in un programma "Wean & Removal" di eradicazione della PRRS probabilmente può dare esito a un maggiore numero di scrofe eliminate e quindi a costi maggiori, però incrementa concretamente le probabilità di successo, riducendo il rischio di lasciare animali "carrier" in allevamento.

Ringraziamenti

Vogliamo ringraziare tutti i tecnici coinvolti negli allevamenti durante il programma di eradicazione della PRRS per lo splendido lavoro fatto e il personale di laboratorio per aver processato con grandiosa accuratezza migliaia di campioni fornendo risultati accurati quasi in tempo reale.

Riferimenti

1. Pesente P., Rebonato V., Sandri GP., Giovanardi D., Sperati Ruffoni L., Torriani S. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. Vet. Microbiol. May 2006 31; 114(3-4): 214-24.
2. Sandri GP., Giovanardi D., Pesente P., Sperati-Ruffoni L., Piemonti D. PRRSV airborne transmission. Not only a theoretical event. A documented case in the real world. Proceedings of the 19th IPVS Congress – Copenhagen July 16-19 2006
3. Sandri GP. PRRS eradication by Wean & Removal in two large sow units working in a multisite system in northern Italy. Can we call it a success? International Symposium on Swine Disease Eradication - University of Minnesota Swine Disease Eradication Center, Minneapolis, Sept. 2001.
4. Revilla-Fernadez S., Wallner B., Truschner K., Benczak A., Brem G., Schmoll F., Muller M., Steinborn R. The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. J. Virol. Methods 2005; 126: 21-30.
5. Guarino H., Goyal SM., Murtaugh MP, Morrison RB, Kapur V. Detection of porcine reproductive and respiratory sindrome virus by riverse transcription-polymerase chain reaction using different regions of the viral genome. J. Vet. Diagnostic Invest. 1999 Jan; 11(1): 27-33.
6. Oleksiewicz MB, Botner A, Madsen KG, Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. Vet. Microbiol. 1998 Nov; 64(1): 7-22.
7. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory sindrome. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 58-62.
8. Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M. Rapida rilevazione e quantificazione della presenza di PRRSV genotipo EU tramite metodica real time RT-PCR. Possibili utilizzi e applicazioni in campo. Atti SIPAS 2007; 243-251.

PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2008

Salsomaggiore Terme (PR), 13-14 marzo 2008

DINAMICA D'INFEZIONE DI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E PRRS VIRUS IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO CON SISTEMA DI SVEZZAMENTO A BANDE TRISETTIMANALI

DYNAMICS OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E *PRRS VIRUS INFECTION IN A FARROW-TO-FINISH HERD WITH THREE-WEEK BATCH FARROWING SYSTEM*

S. GRADELLINI[1], S. NARDELLI[2], C. MAZZONI[3], E. BORRI[1], M. DE MATEO AZNAR[2], L. CEGLIE[2], A. GRANATO[2], M. BOSCARATO[2], E. SCHIAVON[2], F. TONON[4]

[1]Scuola di specializzazione in Patologia Suina – Parma; [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD); [3] Veterinario libero professionista - Reggio Emilia; [4] Veterinario libero professionista - Treviso

Parole chiave: epidemiologia, *M. hyopneumoniae*, PRRSV, svezzamento a bande
Key words: epidemiology, *M. hyopneumoniae*, PRRSV, batch farrowing

Riassunto. La malattia respiratoria nei suini è una causa molto importante di calo di produzione e di perdita economica nell'industria suinicola. Due dei più importanti patogeni associati a polmonite nei suini sono *Mycoplasma hyopneumoniae* e il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV). Attualmente alcune informazioni sono disponibili sulla dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV in una popolazione di suini. A conoscenza degli autori, tuttavia, non esistono attualmente informazioni relative all'epidemiologia dei patogeni respiratori in allevamenti con sistema di svezzamento a bande. Questo lavoro si propone quindi di studiare la dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV in un allevamento con sistema di svezzamento a bande trisettimanali. Sono stati prelevati dei campioni di sangue e tamponi nasali su 30 suini ogni 4 settimane a partire dallo svezzamento fino all'età di macellazione. Successivamente è stata effettuata la tecnica ELISA e la PCR sui campioni prelevati al fine di rilevare rispettivamente la presenza di anticorpi e l'acido nucleico di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV. I risultati hanno evidenziato un'infezione molto tardiva per entrambi i patogeni.

Abstract. Respiratory disease in pigs is a complex and economically significant cause of production losses in swine industry. Two of the most important agents associated with pneumonia in pigs are *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). At this time, some information are available on the dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV infection in a population of pigs. To the Authors knowledge, there are no studies about the epidemiology of respiratory agents in herds with batch farrowing system. Therefore, the objectives of this work are to describe the dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV infection in a herd with three-week batch farrowing system. Blood samples and nasal swabs

were collected in 30 pigs every 4 weeks from weaning to slaughter. ELISA and PCR tests were performed to detect respectively the antibody level and nucleic acid of *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV. The results evidenced a very delayed infection for both pathogens.

INTRODUZIONE

La patologia respiratoria rappresenta, da sempre, un problema complesso nelle ultime fasi di produzione del suino pesante ed è sostenuta dalla combinazione di agenti batterici e virali. Due dei più importanti patogeni associati a sindrome respiratoria sono *Mycoplasma hyopneumoniae* e il virus della PRRS (Thacker et al, 1999).
La malattia respiratoria può essere causa di ingenti perdite economiche dovute alla diminuzione dell'incremento ponderale giornaliero. Per tali motivi, c'è un notevole interesse nella sorveglianza e nel contenimento dei danni dovuti a questi importanti patogeni. Una accurata comprensione dei caratteri epidemiologici e delle modalità di trasmissione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV sono di importanza cruciale per l'implementazione di piani di controllo di successo (Sorensen et al, 2006).
La trasmissione di *Mycoplasma hyopneumoniae* attraverso dei suini portatori è la più comune fonte d'infezione in condizioni di campo. La diffusione avviene principalmente in seguito a contatto diretto (naso-naso) tra soggetti infetti e sani e tramite aerosol quando la densità degli animali e il livello d'infezione sono elevati (Fano et al, 2005). Animali infetti possono diffondere il microrganismo ancora prima della comparsa dei segni clinici o del rilevamento di anticorpi verso *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pieters et Pijoan, 2006).
L'infezione si propaga in sala parto tra le scrofe e i loro suinetti, oppure nei rimescolamenti che avvengono nelle fasi successive di produzione tra soggetti suscettibili e soggetti infetti (Rautiainen et Wallgren, 2001). Individuare il momento preciso dell'infezione non è comunque semplice in quanto gli animali sviluppano anticorpi lentamente e in tempi diversi. Anche all'interno dello stesso allevamento, sia clinicamente o subclinicamente infetto, i suini iniziano a sieroconvertire a differenti età (Vicca et al, 2002). Nei sistemi a flusso continuo, *Mycoplasma hyopneumoniae* e gli altri patogeni respiratori si diffondono comunque in larga parte durante lo svezzamento (Thacker, 2006). Leon et al. (2001) sostengono che il momento critico per la trasmissione di *Mycoplasma hyopneumoniae* sia intorno all'inizio del periodo d'ingrasso, quando i soggetti hanno circa 70 giorni d'età e la maggior parte presenta basse concentrazioni di anticorpi. Questo dato sembra proprio dipendere dal bilancio tra il livello di immunoglobuline ricevute col colostro e la carica infettiva presente nell'azienda (Wallgren et al, 1998).
Per quanto riguarda la PRRS, le modalità di diffusione del virus all'interno di un allevamento sono molto simili a *Mycoplasma hyopneumoniae*: il contatto diretto è la più frequente via di trasmissione in azienda, ma anche molte vie di trasmissione indiretta sono state identificate negli anni recenti (Otake et al, 2002a; Otake et al, 2002b; Otake et al, 2004). La trasmissione per aerosol invece risulta difficilmente dimostrabile in

condizioni di campo e rimane ancora molto controversa (Kristensen et al, 2004; Trincado et al, 2004; Cho et Dee, 2006).
L'infezione da PRRSV si può verificare nel sottoscrofa oppure durante lo svezzamento: l'immunità passiva è di breve durata e decade entro le 3-5 settimane (Melnichouk et al, 2005); i suinetti rimangono quindi suscettibili all'infezione tra le 4 e 10 settimane d'età, in coincidenza con il declino degli anticorpi materni (Albina et al, 1994; Houben et al, 1995; Melnichouk et al, 2005). Il momento culmine d'infezione è comunque tra le 8 e le 10 settimane d'età, periodo di maggiore stress anche a causa degli inevitabili rimescolamenti per la formazione di nuovi gruppi allo svezzamento e il cambiamento di alimentazione. A quest'età, in certi allevamenti ben l'80-100% dei soggetti possono risultare infetti (Dee et Joo, 1994).
Diversi studi sono stati pubblicati relativamente all'epidemiologia dell'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Morris et al, 1995; Leon et al, 2001; Calsamiglia et al, 2002; Ruiz et Pijoan, 2002; Meyns et al, 2004; Sibila et al, 2004; Terreni et al, 2004; Fano et al, 2005; Marois et al, 2006; Sibila et al, 2007a) e PRRSV (Wills et al, 1997a; Wills et al, 1997b; Joo et al, 2000; Grosse-Beilage et Blaha, 2000; Batista et al, 2002; Horter et al, 2002; Wills et al, 2002) in una popolazione di suini. In questi lavori si è preso in considerazione allevamenti convenzionali che adottano un sistema di svezzamento settimanale. Un alternativa a questo sistema che alcuni allevatori stanno adottando è lo svezzamento a bande di 3, 4 o 5 settimane.
Il sistema a bande consente di svezzare un numero maggiore di maiali in una volta sola ma con minor frequenza, e con una differenza d'età minima all'interno di ciascun gruppo: in questo modo, la divisione della popolazione a gruppi d'età consente di interrompere la diffusione dei patogeni tra i suinetti di maggiore età e quelli appena svezzati, riducendo il livello d'infezione nel gruppo (Bown, 2006; Roese et al, 2007).
A conoscenza degli autori, tuttavia, non esistono attualmente informazioni relative alla dinamica d'infezione dei patogeni respiratori in allevamenti con sistema di svezzamento a bande. Questo lavoro si propone quindi di: 1) determinare la diffusione e l'età d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV attraverso l'ausilio della sierologia e della PCR, in un gruppo di suini di un allevamento che adotta un sistema a bande trisettimanali; 2) determinare se la dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV differisce realmente rispetto agli allevamenti convenzionali con svezzamento settimanale.

MATERIALI E METODI

Descrizione dell'allevamento
Lo studio è stato condotto tra agosto 2006 e aprile 2007 in un allevamento a ciclo chiuso a rimonta interna, di 400 scrofe, a 2 siti. I suinetti, svezzati a 28 giorni, sono stati spostati in un altro capannone dove sono rimasti fino a 14 settimane. A quell'età sono stati spostati nel sito 2 dove sono rimasti fino al raggiungimento del peso di macellazione. Sia allo svezzamento sia nel reparto di magronaggio è stato applicato il tutto-pieno/tutto-vuoto. A 23 settimane si è verificato il trasferimento nel capannone d'in-

grasso, sempre all'interno del sito 2, che viene gestito in flusso continuo. I suini utilizzati nello studio sono stati vaccinati verso *Mycoplasma hyopneumoniae* a 1 e 4 settimane di vita, mentre non hanno ricevuto alcuna immunizzazione verso il PRRSV.

Campioni di sangue e tamponi nasali
Sono stati selezionati 30 suini di 5 settimane, cioè a 7 giorni dallo svezzamento, identificati singolarmente con marca auricolare e sottoposti a prelievo ematico a 5, 9, 13, 17 (a circa 3 settimane dall'arrivo in magronaggio), 21, 25, 29, 33, 37 e 41 settimane, cioè al momento della macellazione. I campioni sono stati conservati refrigerati e sottoposti a centrifugazione a 3000 g per 5 minuti: i sieri sono stati poi conservati a -20°C fino all'esecuzione del test sierologico. Circa 200 ml di siero di ogni campione sono stati suddivisi in modo da ottenere 6 pool differenti per l'esecuzione della RT-PCR Multiplex per il PRRSV, effettuata non su tutto il periodo ma solo fino alle 33 settimane di vita.
Sugli stessi soggetti cui è stato effettuato il prelievo di sangue sono stati prelevati dei tamponi nasali (Bundesamt für Veterinärwesen, 2005). I campioni venivano trasportati senza medium al laboratorio, e conservati a -20°C fino all'esecuzione dell'analisi. Il prelievo dei tamponi nasali non ha avuto luogo a 25 settimane e in sede di macellazione.

Sierologia per Mycoplasma hyopneumoniae *e PRRSV*
La presenza degli anticorpi verso *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV è stata determinata attraverso una ELISA indiretta (IDEXX Laboratories). Sono stati riconosciuti positivi i sieri aventi un valore S/P superiore o uguale a 0,4 e negativi quelli inferiori a 0,4. Il test sierologico è stato effettuato solamente fino a 33 settimane nel caso di PRRSV.

Nested-PCR per Mycoplasma hyopneumoniae
I tamponi venivano sospesi in 500 ml di PBS sterile e vigorosamente mescolati. Successivamente veniva effettuata sulla sospensione l'estrazione del DNA, utilizzando il QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen Gmbh; Hilden, Germany).
Per la ricerca e l'identificazione, mediante nested-PCR, di *Mycoplasma hyopneumoniae* sono state utilizzate 2 coppie di primer ottenuti dal gene codificante per la subunità ribosomiale 16S di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia et al, 1999b). I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi in gel di acrilammide al 7% e successivamente visualizzati mediante colorazione del gel con nitrato d'argento.

RT-PCR Multiplex per PRRSV
Le operazioni di estrazione sono state eseguite utilizzando il kit commerciale "High Pure Viral RNA Kit" (Roche Diagnostics) per siero. Si è proceduto poi all'esecuzione della RT-PCR, utilizzando un primer specifico tronco in fase di retro-trascrizione, e un primer senso comune assieme a due primer antisenso, specifici per le sequenze del ceppo europeo ed americano, in fase di amplificazione. Il target è rappresentato da una

regione conservata localizzata in ORF 7 al 3' terminale, codificante per la sintesi della proteina virale del nucleocapside (Persia et al, 2001).
Terminata la RT-PCR, si è proceduto alla rilevazione del prodotto di amplificazione che è stato separato tramite elettroforesi in gel di acrilammide al 7% e visualizzato dopo colorazione del gel con Silver Staining.

RISULTATI

Dei 30 suini iniziali, due sono stati spostati nell'accrescimento scrofette, a cavallo tra il terzo e il quarto prelievo, due suini sono morti rispettivamente a 19 e 27 settimane di vita e altri due sono stati eliminati dallo studio intorno alle 27 settimane per ritardo di crescita.

Nested-PCR e sierologia per Mycoplasma hyopneumoniae
Di tutto il gruppo esaminato si è evidenziata positività alla nested-PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* solamente nella fase di ingrasso, con il 25%, 67% e 58% di positivi rispettivamente a 29, 33 e 37 settimane di età. Solo 3 soggetti dei 24 testati nel periodo dell'ingrasso non hanno mostrato alcuna positività. Negli altri suini si è potuto dimostrare la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* nelle cavità nasali almeno una volta e comunque con una frequenza variabile da soggetto a soggetto.
I campioni di sangue hanno evidenziato una positività sierologica per *Mycoplasma hyopneumoniae* bassa e tendenzialmente decrescente fino a 25 settimane, per poi mostrare un innalzamento dei titoli nel periodo successivo fino a un 100% di positività a 37 settimane di vita.

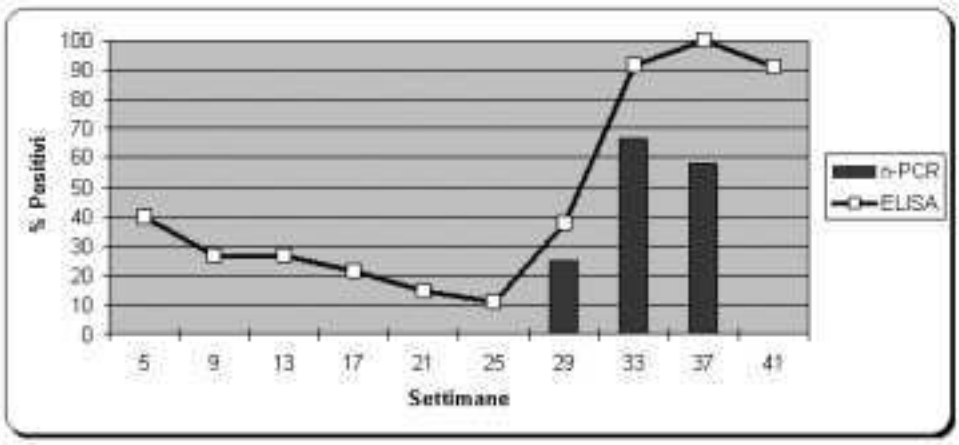


Grafico 1. Percentuale di animali positivi per Mycoplasma hyopneumoniae all'ELISA e alla nested-PCR effettuata sui tamponi nasali nelle diverse età di prelievo.
Graphic 1. *Percentage of animals positive for Mycoplasma hyopneumoniae by ELISA and nested-PCR performed on nasal swabs in the different sampling age.*

L'ELISA indiretta ha evidenziato 12/30 positivi (40%) a 5 settimane e 8/30 positivi (27%) nei soggetti di 9 e 13 settimane, 6/28 positivi (21%) a 17 settimane fino ad arrivare a 4/27 (15%) e 3/27 (11%) suini positivi rispettivamente a 21 e 25 settimane. A partire dalle 29 settimane, in concomitanza con il rilevamento dell'infezione dalle cavità nasali, si è verificato un innalzamento della sieropositività, come si accennava in precedenza, con 9/24 soggetti positivi (38%). Nel prelievo successivo a 33 settimane, ben 22/24 (92%) suini erano positivi, per arrivare a 24/24 (100%) e 10/11 (91%) positivi rispettivamente all'età di 37 e 41 settimane (grafico 1).

RT-PCR e sierologia per PRRSV

I dati relativi all'infezione da PRRSV sono pressoché sovrapponibili a quelli di *Mycoplasma hyopneumoniae* in quanto i suini hanno mostrato una viremia in corso a 25 settimane, cioè a 2 settimane dall'arrivo all'ingrasso. Nei prelievi successivi solo 1 pool ha evidenziato positività a 29 settimane, segno che la viremia è decaduta nel giro di poche settimane. Tutti i restanti campioni sono risultati negativi.

L'ELISA indiretta per il rilevamento del titolo anticorpale verso PRRSV non ha subìto l'influenza, come nel caso di *Mycoplasma hyopneumoniae*, delle eventuali interferenze vaccinali, dimostrando una spiccata sieroconversione a 25 settimane contemporaneamente al rilevamento della viremia da PRRSV. nfatti, dopo un'iniziale positività in alcuni soggetti a 5 settimane (4/30 positivi), probabilmente dovuta all'immunità materna, tutti i campioni sono risultati negativi fino a 21 settimane. L'ELISA indiretta ha poi evidenziato 23/27 positivi (85%) a 25 settimane, 22/24 positivi (92%) a 29 settimane e infine 24/24 positivi (100%) a 33 settimane (grafico 2).

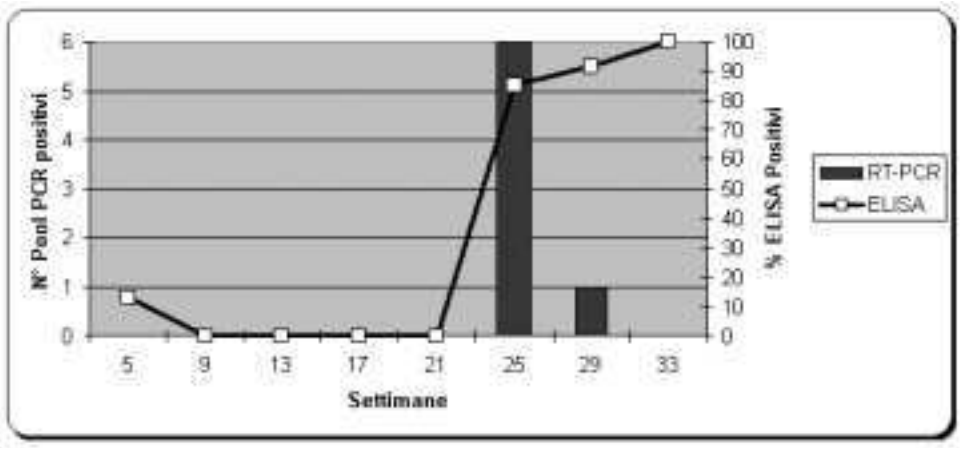


Grafico 2. Percentuale di animali positivi all'ELISA e quantità di pool PCR positivi per PRRSV nelle diverse età di prelievo.

Graphic 2. *Percentage of animals positive by ELISA and quantity of pool PCR positive for PRRS in the different sampling age.*

DISCUSSIONE

L'utilizzo combinato della tecnica sierologica e della PCR per il rilevamento dell'acido nucleico di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV hanno fornito utili informazioni sulla dinamica d'infezione dei due patogeni nell'allevamento oggetto dello studio. I risultati sopra riportati ci indicano palesemente come l'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV si sia verificata in età piuttosto tardiva, cioè dopo le 23 settimane, discostandosi largamente dai periodi classici d'infezione riscontrati in allevamenti convenzionali e come risulta da diversi lavori (Vicca et al, 2002; Sibila et al, 2004; Dee et Joo, 1994; Houben et al, 1995; Melnichouk et al, 2005; Sibila et al, 2007b).
Nel caso di *Mycoplasma hyopneumoniae*, il riscontro di una risposta anticorpale rilevata nelle prime 25 settimane di vita è con tutta probabilità imputabile inizialmente all'immunità materna (Morris et al, 1994), successivamente alla stimolazione vaccinale. Gli esiti sierologici non hanno infatti mai mostrato una reale sieroconversione nei soggetti fino a quell'età. Inoltre, non solo la maggior parte dei suini ha mostrato un calo progressivo dei titoli anticorpali fino alle 25 settimane, età in cui si è evidenziato con l'ELISA il minor numero di positivi di tutto il ciclo produttivo, ma i titoli espressi in S/P ratio non hanno mai raggiunto valori così alti come quelli rilevati dopo la dimostrazione dell'infezione nel gruppo. È stato invece frequente il riscontro di soggetti che tendevano a negativizzarsi per poi tornare positivi e ancora negativi, manifestando un titolo molto oscillante, tipico di soggetti vaccinati. La bassa percentuale di suini sierologicamente positivi in seguito a vaccinazione può essere dovuta alla scarsa sensibilità del test ELISA nel rilevare gli anticorpi post-vaccinali verso *Mycoplasma hyopneumoniae* (Maes et al, 1999; Erlandson et al, 2005). La parziale mancanza di sieroconversione dopo vaccinazione da *Mycoplasma hyopneumoniae* è stata descritta anche in diversi altri lavori (Scheidt et al, 1994; De Jong et al, 1996; LeGrand et Kobisch, 1996; Maes et al, 1998; Maes et al, 1999; Chittick et al, 2002).
La conferma di quanto detto finora ci viene fornita dai risultati della n-PCR sui tamponi nasali, che non hanno effettivamente dimostrato un infezione in atto fino alle 25 settimane. È noto anche come il reservoir principale di *Mycoplasma hyopneumoniae* è rappresentato dal polmone, dunque è presente in quantità inferiori nelle cavità nasali rispetto alle basse vie respiratorie (Mattsson et al, 1995; Sorensen et al, 1997; Calsamiglia et al, 1999a; Verdin et al, 2000). Per questo devono essere presi in considerazione possibili falsi negativi nella lettura dei risultati e il livello d'infezione nel gruppo può essere sottostimato. Comunque il riscontro di un risultato positivo alla nested-PCR sui tamponi nasali rimane ancora molto controverso e non significa automaticamente che il suino stia diffondendo attivamente microrganismi vitali (Vicca et al, 2002). Nel nostro caso, il rilevamento del patogeno dalle cavità nasali si è confermato comunque uno strumento molto utile nel studiare la dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae*, soprattutto se usato in combinazione con la sierologia.
Il rilevamento del DNA di *Mycoplasma hyopneumoniae* ha assunto inoltre una notevole variabilità in tutto il periodo d'ingrasso: soggetti positivi si sono negativizzati per poi tornare positivi al prelievo successivo o rimanere negativi. Questi dati confermano quelli di altri autori secondo i quali la presenza del microrganismo nelle cavità nasali

può variare sensibilmente durante il corso dell'infezione (Mattsson et al, 1995; Calsamiglia et al, 1999a; Pieters et Pijoan, 2006).
Il modello di diffusione di PRRSV risulta pressoché sovrapponibile con quello di *Mycoplasma hyopneumoniae*. La mancanza di viremia e la bassa sieropositività rilevata nei suinetti di 5 settimane, fa pensare a una relativa stabilità della circolazione del virus nel parco scrofe e a una mancata trasmissione di PRRSV per via verticale. Il virus ha iniziato a circolare nell'ingrasso, dove i suini sono risultati viremici già a 2 settimane dall'arrivo. La viremia si è poi esaurita in breve tempo e al prelievo successivo solo un pool ha mostrato positività. È noto infatti come la viremia si instauri normalmente già a 24 ore dall'infezione (Murtaugh, 2005) e diviene non più rilevabile entro 35 giorni, sebbene lo stato di viremia può persistere più a lungo (Johnson et al, 2004).
Alcuni studi (Clark et al, 1991; Vicca et al, 2002; Sibila et al, 2004; Calsamiglia et al, 2002; Sibila et al, 2006) hanno dimostrato che diversi fattori ambientali come la tipologia di sistema produttivo, le caratteristiche strutturali dell'allevamento, le condizioni climatiche e il management, possono influenzare in maniera significativa la dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* all'interno di un allevamento. Le stesse considerazioni si possono fare per la PRRS, dove l'espressione della malattia e la dinamica d'infezione sono anch'essi influenzati da svariati fattori ambientali, anche se non ben definiti (Zimmerman et al, 2006).
In particolare, alcune strategie manageriali come l'adozione del tutto-pieno/tutto-vuoto e il mantenimento di una bassa densità di animali, possono comportare una notevole diminuzione della pressione infettiva, ritardando la comparsa dell'infezione e riducendo talvolta la gravità della malattia respiratoria (Cargill et al, 1996a; Cargill et al, 1996b; Cargill et Banhazi, 1996b; Cargill et Banhazi, 1998; Cargill, 2000).
Alcuni Autori pongono l'accento anche sulla tipologia di sistema produttivo: Sibila et al. (2004) hanno dimostrato come la dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* differisce significativamente tra gli allevamenti con 1 o 2 siti rispetto a quelli con un sistema a 3 siti. Infatti, un suino allevato in un sistema di produzione a 1 o 2 siti ha maggiori probabilità di contrarre l'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* rispetto a un suino allevato in un sistema a 3 siti. La separazione fisica dei suini di diverse fasi produttive in 3 siti diversi, ha infatti l'effetto di interrompere la possibilità di trasmissione orizzontale del patogeno tra gruppi diversi. Lo svezzamento precoce a 7-10 giorni di vita viene ulteriormente raccomandato per minimizzare il rischio di trasmissione verticale dei patogeni tra la scrofa e il suinetto (Sorensen et al, 2006).
In modo del tutto analogo si comportano il sistema di svezzamento a bande e l'Aged Segregated Rearing (ASR). La chiave di volta di queste strategie è la divisione dei suini per gruppi di età, minimizzando in tal modo la trasmissione dei patogeni dai soggetti più vecchi a quelli più giovani di nuova entrata (Cargill, 1996; Cargill, 1997; Cargill et al, 2000). Per ottenere i massimi benefici, è molto importante che ciascun reparto o capannone sia gestito con il TPTV e che tutti i suini siano rimossi prima dell'arrivo della banda successiva (Cargill, 1996). Questo sistema, attraverso la riduzione della pressione infettiva, consente sostanziali miglioramenti dello standard sanitario dell'allevamento, portando indirettamente a un miglioramento dell'accrescimento medio

giornaliero, dell'indice di conversione, della mortalità e dei costi di medicazione, con risultati paragonabili, se non superiori, a quelli del sistema 3-site (Cargill et al, 2000; Armstrong, 2002; Roese et al, 2007).
Nel nostro caso, lo svezzamento a bande trisettimanali ha sicuramente condizionato l'evoluzione e il decorso dell'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV all'interno dell'allevamento oggetto dello studio, ritardando la comparsa dell'infezione fino alle 25 settimane d'età. Questo sistema può aver impedito la circolazione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV durante lo svezzamento, periodo maggiormente critico quando i suini presentano basse concentrazioni anticorpali e sono più soggetti a stress per i continui spostamenti o i cambi d'alimentazione. Un altro fattore che è stato certamente determinante nel ridurre la pressione infettiva nell'allevamento è stato il TPTV, rigorosamente applicato sia allo svezzamento sia in magronaggio, e senza il quale i benefici ottenibili con il sistema a bande sarebbero minimi. L'importanza della pulizia sulle performances e sullo stato di salute degli animali risulta chiaramente evidente in alcuni lavori (Cargill et Banhazi, 1996a; Cargill, 2001): secondo gli autori, non ci sono differenze significative nel tasso di crescita tra suini allevati in capannoni gestiti in TPTV non lavati e suini allevati in flusso continuo. Al contrario, una corretta pulizia interviene favorevolmente nella riduzione delle malattie respiratorie e delle lesioni polmonari al macello (Cargill, 2000).

CONCLUSIONI

Le metodiche e la tempistica dei prelievi effettuati per lo studio ci hanno consentito di cogliere con buona precisione il periodo d'infezione. La PCR e la tecnica ELISA per il rilevamento del titolo anticorpale si sono confermati ottimi strumenti per indagare sulla dinamica d'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV, se usati in combinazione tra loro. In particolare, il rilevamento del DNA di *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante n-PCR ha permesso di differenziare una positività sierologica indotta dalla vaccinazione rispetto a una positività indotta da infezione naturale. I titoli anticorpali verso *Mycoplasma hyopneumoniae* espressi in S/P ratio hanno assunto valori superiori a 1 solo dopo la dimostrazione dell'infezione, segno che titoli elevati trovano generalmente riscontro nei casi in cui i suini sono naturalmente esposti all'infezione, mentre titoli positivi ma medio-bassi sono da imputare più facilmente alla vaccinazione. Queste affermazioni necessitano comunque di ulteriori conferme e approfondimenti.
La tipologia di sistema produttivo e il management si sono confermati come fattori fortemente condizionanti la circolazione di *Mycoplasma hyopneumoniae* e PRRSV nell'allevamento. La gestione in bande trisettimanali, unitamente all'applicazione del TPTV e di corrette pratiche igienico-sanitarie anche in magronaggio, hanno consentito un'efficace riduzione della presenza dei due patogeni nell'ambiente, consentendo un notevole ritardo dell'infezione. Si è potuto dunque dimostrare che con la suddivisione in bande esiste una possibilità di trasmissione di patogeni estremamente più bassa rispetto ad un allevamento convenzionale.

Il sistema di svezzamento a bande diventa così una strategia macrogestionale da non sottovalutare nel controllo delle patologie infettive, e si offre come valida alternativa all'utilizzo del sistema multi-site, che spesso risulta di difficile attuazione per le realtà suinicole italiane.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e Fort Dodge per la collaborazione concessa e per aver reso possibile la realizzazione del lavoro.

BIBLIOGRAFIA

Albina E, Madec F, Cariolet R, Torisson J (**1994**): Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. Vet Rec 134, 567-573.

Armstrong D (**2002**): An introduction to batch farrowing. Meat and Livestock Commission - October 2002, www.npa-uk.org.uk/ds_portal/library/DerekArmstrongBatch.doc

Batista L, Dee SA, Rossow KD, Deen J, Pijoan C (**2002**): Assessing the duration of persistence and shedding of PRRSV in a large population of breeding-age gilts. Can J Vet Res 66, 196-200.

Bown P (**2006**): Advantages and disadvantages of batch farrowing. In Practice 28, 94-96.

Bundesamt für Veterinärwesen – Ufficio federale di veterinaria (**2005**): Direttive tecniche concernenti il prelievo di campioni e la loro analisi riguardo alla polmonite enzootica dei suini (PE). Direttive tecniche del 14 aprile 2003 (modificate il 22 giugno 2005), 1-2.

Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A (**1999a**): Application of a nested PCR assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J Vet Diagn Invest 11, 246-251.

Calsamiglia M, Pijoan C, Bosch GJ (**1999b**): Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested-PCR technique. Swine Healt Prod 7 (6), 263-268.

Calsamiglia M, Sibila M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen JCE (**2002**): Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in different spanish production systems using nested PCR and ELISA. Proceedings of the 17th IPVS Congress 2002, Ames, Iowa, volume 1, 102.

Cargill C (**1996**): Reducing the impact of disease on growing pigs. Pig Industry News, June, 62:23-25.

Cargill C, Banhazi T (**1996a**): Cleaning sheds between batches has effect on growth rate. S.A. Pig and Poultry Fair 1996, Pig and Poultry Production Institute Research and Extension Summaries. Pig Industry News, September, 63:9.

Cargill C, Banhazi T (**1996b**): Production benefits of all-in/all-out pig management systems. S.A. Pig and Poultry Fair 1996, Research and Extension Summaries. S.A. Pig and Poultry Fair 1996, Pig and Poultry Production Institute Research and Extension Summaries. Pig Industry News, September, 63:15.

Cargill C, Skirrow SZ, Banhazi T (**1996a**): The relationship between pig population size, stocking density, air quality parameters and pleurisy in pig herds. Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologne, Italy, 521.

Cargill C, Skirrow S, Banhazi T (**1996b**): Stocking density influences air quality and the incidence of respiratory disease in grower herds. S.A. Pig and Poultry Fair 1996, Pig and Poultry

Production Institute Research and Extension Summaries. Pig Industry News, September, 63:7.

Cargill C (**1997**): Age-Segregated Rearing and All-In/All-Out management. S.A. Pig and Poultry Fair 1997, Pig and Poultry Production Institute, Health and Production Research Seminar Notes.

Cargill C, Banhazi T (**1998**): The importance of cleaning in all-in/all-out management systems. Proceedings 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, England, 3:15.

Cargill C (**2000**): All-in/all-out housing systems improve herd health, hygiene and air quality. Pig Industry News, September, 79:11-13.

Cargill C, Lloyd B, Pope G, Moore M, Tritton S, Chenoweth V (**2000**): Batch farrowing and aged-segregated rearing. S.A. Pig and Poultry Fair 2000, Seminar Notes and Pig and Poultry Production Institute Research Summaries, 10.

Cargill C (**2001**): Age-Segregated housing of pigs – Benefits. Pigpen, April, 27.

Chittick W, Holck JT, Polson DD, Luehrs A, Miller S (**2002**): Capabilities of two *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA serologic assays. Proceedings of the 17th IPVS Congress 2002, Ames, Iowa, 76.

Cho GC, Dee SA (**2006**): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenology 66, 655-662.

Clark LK, Scheidt AB, Armstrong CH (**1991**): The effect of all-in/all-out management on pigs from a herd with enzootic pneumonia. Vet Med 86, 946-951.

De Jong M, Jedema E, Sampimom O (**1996**): *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in 10 week old piglets, results of a field trial. In: Proceedings of the 14th IPVS Congress 1996, Bologna, Italy, 220.

Dee SA, Joo HS (**1994**): Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. Vet Rec 135, 6-9.

Erlandson KR, Evans RB, Thacker BJ, Wegner MW, Thacker EL (**2005**): Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Swine Health Prod 13 (4), 198-203.

Fano E, Pijoan C, Dee S (**2005**): Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumonia*e infection in pigs. Can J Vet Res 69, 223-228.

Grosse-Beilage E, Blaha T (**2000**): A longitudinal study into the interaction between PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* in finishing pigs. Vet Res 31, 88-89.

Horter DC, Pogranichniy RM, Chang CC, Evans RB, Yoon KJ, Zimmerman JJ (**2002**): Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet microbial 86, 213-228.

Houben S, Van Reeth K, Pensaert MB (**1995**): Pattern of infection with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on swine farms in Belgium. J Vet Med 342, 209-215.

Johnson W, Roof M, Vaughn E, Christopher-Hennings J, Johnson CR, Murtaugh MP (**2004**): Pathogenic and humoral immune responses to PRRSV are related to viral load in acute infection. Vet Immunol Immunopathol 102, 233-247.

Joo HS, Direksin K, Johnson C (**2000**): Seroepidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on commercial farms. Vet Res 31, 85-86.

Kristensen CS, Bøtner A, Takai H, Nielsen JP, Jorsal SE (**2004**): Experimental airborne transmission of PRRS virus. Vet Microbiol 99, 197-202.

LeGrand A, Kobisch M (**1996**): Comparaison de l'utilisation d'un vaccine et d'un traitement antibiotique sequential dans un élevage infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Res 27, 241-253.

Leon EA, Madec F, Taylor NM, Kobisch M (**2001**): Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. Vet Microbiol 78, 331-341.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Lein A, Vrijens B. and De Kruif A (**1998**): The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. J Vet Med B 45, 495-505.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, Verbecke W, Viaene J. and De Kruif A (**1999**): Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. Vaccine 17, 1024-1034.

Marois C, Fablet C, Le Devendec L, Madec F, Kobisch M (**2006**): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from post-weaning and fattening pigs in 12 farms in France. Proceedings of the 19th IPVS Congress 2006, Copenhagen, Denmark, volume 2, 206.

Mattsson JG, Bergstrom K, Wallgren P, Johansson KE (**1995**): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 33, 893-897.

Melnichouk O, Dewey CE, Friendship RM, Haydon DT (**2005**): Seroepidemiological study of PRRS virus infection patterns by age in nursery pigs on seven commercial farms in Ontario, Canada. Prev Vet Med, in press.

Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, De Kruif A (**2004**): Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. Prev Vet Med 66, 265-275.

Meyns T, Dewulf J, De Kruif A, Calus D, Haesebrouck F, Maes D (**2006**): Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. Vaccine, doi:10.1016/j.vaccine.2006.07.004.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM (**1994**): Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. Prev Vet Med 21, 29-41.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM (**1995**): Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. Prev Vet Med 21, 323-337.

Murtaugh M (**2005**): Interazione tra PRRSV e sistema immunitario del suino. Atti del convegno "PRRS: fatti vs speculazioni", Parma, 27-28 ottobre 2005, 63-72.

Otake S, Dee AS, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, Pijoan C (**2002a**): Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. Vet Rec 150, 114-115.

Otake S, Dee AS, Rossow KD, Deen J, Joo HS, Molitor TW, Pijoan C (**2002b**): Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). J Swine Health Prod 10 (2), 59-65.

Otake S, Dee AS, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Pijoan C (**2004**): Studies on the carriage and transmission of PRRS virus by individual houseflies (*Musca domestica*). Vet Rec 154, 80-85.

Persia D, Pacciarini ML, Cordioli P, Sala G (**2001**): Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples. International Symposium of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology, Salsomaggiore Terme (PR) 4-7/07/2001.

Pieters M, Pijoan C (**2006**): Detection pattern of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in experimentally infected pigs. Proceedings of the 19th IPVS Congress 2006, Copenhagen, Denmark, volume 2, 209.

Rautiainen E, Wallgren P (**2001**): Aspects of the transmission of protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* from sow to offspring. J Vet Med B 48, 55-65.

Roese G, Taylor G, Morgan J (**2007**): Batch farrowing for the pig industry. Primefact 143, January 2007, 1-6.

Ruiz A, Pijoan C (**2002**): Shedding of *Mycoplasma hyopneumoniae* from commercial naturally infected pigs. Proceedings of the 17th IPVS Congress 2002, Ames, Iowa, volume 1, 104.

Scheidt A, Mayrose V, Van Alstine W, Clark K, Cline T, Einstein M (**1994**): The effects of vaccinating pigs for mycoplasmal pneumonia in a swine herd affected by enzootic pneumonia. Swine Healt Prod 2, 7-11.

Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen J (**2004**): Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. Can J Vet Res 68, 12-18.

Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Soria S, Segales J, Valero O, Espinal A, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M (**2006**): Are *Mycoplasma hyopneumoniae* infection and sieroconversion dynamics influenced by climatologic parameters. Proceedings of the 19th IPVS Congress 2006, Copenhagen, Denmark, volume 1, 99.

Sibila M, Nofrarìas M, Lòpez-Soria S, Segalés J, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M (**2007a**): Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. Vet Microbiol 121, 352-356.

Sibila M, Nofrarìas M, Lòpez-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M (**2007b**): Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. Vet Microbiol 122, 97-107.

Sorensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, Bille-Hansen V, Jensen NE and Pedersen MW (**1997**): *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet Microbiol 54, 23-34.

Sorensen V, Jorsal SE, Mousing J (**2006**): Diseases of the respiratory system. In: "Diseases of swine", Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, 9th edition, Blackwell Publishing, 149-177.

Terreni M, Guazzetti S, Foni E, Barigazzi G, Cavirani S, Martelli P (**2004**): Studio longitudinale sulla dinamica dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* in un allevamento a ciclo chiuso. Atti del XXX meeting annuale SIPAS, Salsomaggiore Terme, 25-26 marzo 2004, 335-346.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R and Thacker BJ (**1999**): *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J Clin Microbiol 37, 620-627.

Thacker EL (**2006**): Mycoplasmal diseases. In: "Diseases of swine", Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J., 9th edition, Blackwell Publishing, 701-707.

Trincado C, Dee S, Jacobson L, Otake S, Rossow K, Pijoan C (**2004**): Attempts to transmit porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosols under controlled field conditions. Vet Rec 154, 294-297.

Verdin E, Saillard C, Labbé A, Bové JM, Kobisch M (**2000**): A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. Vet Microbiol 76, 31-40.

Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, De Kruif A (**2002**): Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. J Vet Med B 49, 349-353.

Wallgren P, Bölske G, Gustafsson S, Mattson S, Fossum C (**1998**): Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. Vet Microbiol 60, 193-205.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA (**1997a**): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet Microbiol 55, 231-240.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt

KB (**1997b**): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. Vet Microbiol 57, 69-81.

Wills RW, Doster AR, Osorio FA (**2002**): Transmission of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) to age-matched sentinel pigs. J Swine Health Prod 10 (4), 161-165.

Zimmerman JJ, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, Torremorell M (**2006**): Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. In: "Diseases of swine", Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, 9th edition, Blackwell Publishing, 387-417.

PREMIO
MARIA, GIUSEPPE E ING. GIUSEPPE JR ZANELLA

Salsomaggiore Terme (PR), 13-14 marzo 2008

INDAGINI CLINICO-PATOLOGICHE IN UN FOCOLAIO DI PMWS (POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME) E METODI DIAGNOSTICI A CONFRONTO

CLINICAL AND PATHOLOGICAL INVESTIGATION IN AN OUTBREAK OF PMWS (POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME) AND DIAGNOSTIC METHODS COMPARISON

F. PAOLETTI°, A. LUPPI*, M. BOSETTI°, R. DI LECCE**, P. BONILAURI*, P. CORDIOLI*

° *Medico Veterinario, libero professionista; * Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ** Dipartimento di Sanità Animale, Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma*

Parole chiave: grading cito-istologico, linfonodi, real time PCR, PMWS
Key words: cyto-histolological grading, lymph nodes, real time PCR, PMWS

Riassunto. Nel presente lavoro sono stati esaminati attraverso l'impiego della citologia, dell'istologia e della real time PCR i linfonodi inguinali superficiali di 20 suini presentanti sintomatologia clinica compatibile con PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome). Dalla comparazione delle diverse indagini è stato possibile formulare un "grading" dei quadri cito-istologici e distinguere i casi osservati in 3 gruppi. Tutti i casi diagnosticati come PMWS presentano un n° elevato di copie di acido nucleico virale, che raggiunge i valori maggiori per i casi inquadrati nel gruppo III (casi finali). Il "grading" delle lesioni linfonodali confrontato con l'analisi quantitativa del virus a livello di questi organi, assume particolare interesse per il diverso significato diagnostico attribuibile a casi sospetti di PMWS, in funzione del loro inquadramento nel grado I, II o III. In conclusione l'indagine citologica può essere impiegata con successo come esame collaterale nella diagnosi di PMWS, potendo fornire anche informazioni sul grado della lesione linfonodale.

Abstract. Samples from 20 swine lymph nodes (*ln. inguinales superficiales*) with PMWS clinical signs were submitted for cytological, histological and real time PCR examination in order to establish a cytological grading. In this comparative study the cases were collected in three groups with mild, moderate and severe lymphoid microscopic lesions (group I, II, III respectively). High viral load was observed in all PMWS cases but the higher amount of virus was found in samples collected in the group III (final case). Cytological examination appeared in our experience as an important complementary diagnostic tool in the diagnosis of PMWS and usefully to determine the grade of lesions.

PREMESSE

Lo studio morfologico della popolazione cellulare linfonodale assume grande importanza nella comprensione di processi patologici che colpiscono primariamente i linfonodi o organi di cui questi sono tributari.
In patologia suina, in particolare, l'esame citologico si è dimostrato un sussidio diagnostico assai importante nella valutazione di casi di linfoadenomegalia, permettendo la valutazione, in tempi brevi ed a costi contenuti, di un numero elevato di campioni linfonodali di suini con sospetto clinico ed anatomopatologico di PMWS. Questo ha permesso l'impiego della citologia anche in studi comparativi, atti a verificare l'eventuale correlazione tra la gravità delle lesioni linfonodali e la quantità di virus presente a livello dei linfonodi (Luppi et al., 2004).
La diagnosi della PMWS, inizia dall'osservazione dei segni clinici e anatomopatologici, che sono indicativi ma non patognomonici (Harding e Clark, 1997; Allan et al., 1998; Balasch et al., 1998; Brodersen, 1998; Kennedy et al., 1998; Segalés et al., 1998a; Marcato et al., 1999), passa dalla dimostrazione delle caratteristiche lesioni istopatologiche, soprattutto a carico degli organi linfoidi e si conclude con la dimostrazione dell'antigene virale a livello dei tessuti sede delle lesioni (Harding e Clark, 1997; Ellis et al., 1998; Kiupel et al., 1998; Rossow, 1998; Segalés et al., 1998b; Marcato et al., 1999). Oggi nella diagnosi di PMWS possono essere impiegate anche tecniche biomolecolari raffinate, che permettono di quantificare la presenza di virus a livello sierico e tessutale (Harms et al., 2001; Olvera et al., 2004).
L'obiettivo del presente lavoro è quello di eseguire un'analisi comparativa tra diverse metodiche diagnostiche, con particolare riferimento all'impiego della citologia come metodo rapido collaterale nella diagnosi di PMWS e di comparare i risultati della gradazione cito-istologica delle lesioni linfonodali con l'esito dell'indagine quantitativa tramite real time PCR sui linfonodi oggetto dello studio.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un unico allevamento a ciclo chiuso di 1500 scrofe, situato in provincia di Cremona, con anamnesi PMWS-compatibile, nel quale numerosi suinetti nelle fasi di post-svezzamento e svezzamento presentavano sintomatologia prevalentemente respiratoria, contemporaneamente ad un elevato numero di animali con deperimento organico.
Nell'allevamento sono stati individuati 20 soggetti di età compresa tra 5 e 12 settimane, con un peso compreso tra 10 e 35 kg, che presentavano un evidente stato di deperimento organico e quadri di linfoadenomegalia generalizzata più o meno marcata (Tabella 1 e 2).
Contestualmente all'esame necroscopico è stato eseguito il campionamento dei linfonodi inguinali superficiali. I linfonodi sono stati suddivisi in due emisezioni, una utilizzata per l'allestimento di preparati citologici per impronta, l'altra fissata in formalina tamponata al 10% per l'allestimento di sezioni istologiche.

Tab. 1. Sintomi clinici osservati in 20 suini di età compresa tra 5 e 12 settimane.
Tab. 1. *Clinical signs observed in 20 pigs, 5 to 12 weeks old.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Deperimento organico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X		
Scarso accrescimento	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X		X		
Sintomi respiratori*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Pallore cutaneo	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
Necrosi coda/orecchie				X		X	X	X												

*Tosse e dispnea

Tab. 2. Lesioni anatomo-patologiche osservate in 20 suini di età compresa tra 5 e 12 settimane.
Tab. 2. *Gross pathology observed in 20 pigs, 5 to 12 weeks old.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Linfoadeno=megalia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	
Polmonite interstiziale	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
Cardiomegalia						X	X	X			X	X	X					X	X	
Nefrite interstiziale			X	X		X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	
Pallore carcassa	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
Ittero	X		X			X				X			X							

La sezione del linfonodo, utilizzata per l'allestimento di preparati citologici per impronta, è sempre stata attuata cercando di ottenere una superficie linfonodale relativamente estesa ed, in tal modo, una popolazione cellulare la più rappresentativa possibile. I campioni citologici sono stati essiccati all'aria, colorati con il metodo May Grunwald-Giemsa e letti al microscopio ottico. Per la determinazione del grado citologico sono stati scelti 5 campi a 400 ingrandimenti ed è stata eseguita una valutazione percentuale delle popolazioni cellulari presenti in modo da ottenere una classificazione dei casi osservati in 3 gruppi (Tabella 3).

Tab. 3. Parametri impiegati per la valutazione del grado citologico.
Tab. 3. *Parameters used for the assessment of the cytological grading.*

Grado	Quadro citologico	Diagnosi
I	Cellule linfocitarie > 80% Cellule macrofagico –istiocitarie <20%	Forme Sub-cliniche, forme iniziali della malattia; forme in via di guarigione
II	Cellule linfocitarie 70-80% Cellule macrofagico –istiocitarie 20-30%	PMWS
III	Cellule linfocitrie 40-70% Cellule macrofagico –istiocitarie 30-60%	PMWS

La porzione linfonodale impiegata per l'esecuzione dell'impronta per l'esame citologico è stata successivamente congelata per essere impiegata nella indagine virologica per PCV2 tramite real time PCR. Per l'esecuzione della PCR quantitativa è stato seguito il metodo indicato da Olvera et al. (2004).

I primer impiegati vengono riportati nella tabella seguente (Tabella 4).
L'esame istologico è stato eseguito su campioni linfonodali fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati al microtomo al fine di ottenere preparati di 5 mm di spessore colorati con ematossilina-eosina.
Le lesioni istologiche sono state suddivise in 3 gruppi: iniziali (grado I), intermedie (grado II) e finali (grado III), seguendo lo schema proposto da Sarli et al. (2001).
Durante l'esame necroscopico, oltre ai linfonodi, sono stati prelevati la milza, il fegato, i reni, le anse intestinali e i polmoni per essere sottoposti ad indagine istopatologica.

Tab. 4. Sequenza, localizzazione e proprietà dei primer e della sonda disegnati per la real time PCR del PCV-2 (Olvera A. et al., 2004).
Tab. 4. *Sequence, localisation and properties of primers and probe designed for the PCV-2 real time PCR (Olvera A. et al., 2004).*

Oligo	Tm (°C)	% CG	bp	Sequenze (5'→3')	Localizzazione nel genoma del PCV2
PCV2 F	60	63	19	CCAGGAGGGCGTTGTGACT	1535→1553
PCV2R	59	55	20	CGCTACCGTTGGAGAAGGAA	1633→1614
PCV2S	68	52	25	AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT	1612→1592

RISULTATI

I quadri citologici osservati, caratterizzati prevalentemente da ipocellularità del campione e dalla presenza più o meno marcata di elementi rotondocellulari macrofagico-istiocitari, hanno permesso di formulare un indirizzo diagnostico ed una gradazione del quadro citologico osservato in 15 casi su 20. In tal modo sulla base delle osservazioni citologiche i campioni analizzati sono stati classificati come negativi (1 caso), come grado I (1 caso), come grado II (3 casi) e come grado III (10 casi). In 5 casi l'esito dell'esame citologico è stato non conclusivo a causa del non ottimale stato di conservazione dei linfonodi impiegati per l'esecuzione delle impronte. In questi casi, infatti, l'eccessiva ipocellularità del campione e la prevalente presenza di "nuclei nudi" (cellule che hanno perduto la componente citoplasmatica) non hanno permesso una diagnosi definitiva.
Le lesioni istologiche osservate a carico dei linfonodi, riassunte in tabella 5, hanno permesso la diagnosi di PMWS in 18 casi su 20, mentre 2 campioni sono risultati negativi.
Dall'esame della tabella si osserva come in un suino, (campione n°14), la valutazione istologica abbia evidenziato lesioni, classificate come iniziali (grado I), caratterizzate da una modica deplezione linfocitaria in presenza di una struttura linfonodale in prevalenza mantenuta. In questo contesto si rileva una preminenza di tessuto linfoide, accompagnato da modici infiltrati di elementi cellulari macrofagico-istiocitari. I 5 campioni (2, 7, 8, 9, 16), classificati come intermedi (grado II), sono caratterizzati dalla quasi assenza di follicoli e da una maggiore deplezione linfocitaria; in questi

casi viene rilevata una consistente rarefazione delle aree linfoidi, che conferisce ai linfonodi un aspetto disomogeneo con piccole aree popolate prevalentemente da linfociti ed altre occupate quasi esclusivamente da elementi cellulari macrofagico-istiocitari e da cellule giganti multinucleate. Nei 12 casi (3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20), inquadrati come finali (grado III), è stata osservata la completa assenza dei follicoli linfatici, un'intensa infiltrazione di elementi cellulari macrofagico-istiocitari ed una forte deplezione linfocitaria associata alla proliferazione dello stroma fibro-vascolare.

Tab. 5. Lesioni istologiche a carico dei linfonodi.
Tab. 5. *Lymph nodes histological lesions.*

	Quadro istologico			
N° campione	Infiltrazione cellule macrofagico-istiocitarie	Presenza cellule giganti multinucleate	Necrosi	Deplezione linfocitaria
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	++	-	-	++
4	++	-	-	++
5	++	-	+	++
6	++	-	-	++
7	+	+	-	+
8	+	-	+	+
9	+	++	-	+
10	++	-	-	++
11	++	-	-	++
12	++	-	-	++
13	++	+	-	++
14	+	-	-	+
15	-	-	-	-
16	+	+	-	+
17	++	-	-	++
18	++	-	-	++
19	++	-	-	++
20	++	-	-	++

Nei casi diagnosticati come PMWS, l'analisi istopatologica degli altri tessuti prelevati durante l'esame necroscopico ha evidenziato: in 7 casi (7, 9, 11, 12, 13, 16 e 18) a carico del polmone, quadri di edema alveolare diffuso e di polmonite interstiziale a carattere focale caratterizzata dall'ispessimento dei setti alveolari, con infiltrazione di cellule mononucleate, principalmente macrofagi e linfociti e occasionalmente cellule giganti multinucleate; in 4 casi (4, 7, 11 e 16), quadri di nefrite tubulo-interstiziale focale o multifocale; in 3 casi (3, 7 e 16), quadri di epatite linfoistiocitaria periportale con focolai di necrosi e fibrosi nel campione n.3; in 4 casi (7, 14, 16 e 19), quadri di atrofia follicolare a livello splenico, con infiltrazioni di elementi cellulari macrofagico-istiocitari.
I risultati dell'indagine virologica condotta tramite real time PCR sono riassunti in tabella 6, dove vengono riportati anche i dati relativi alla diagnosi e alla gradazione

cito-istologica. In media i linfonodi dei soggetti di grado III (9.7 log copie DNA / g) hanno un numero di copie virali significantemente maggiore (Kruskal-Wallis test $p<0.01$) dei rimanenti soggetti (7.6 log copie DNA / g).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In patologia suina la linfoadenomegalia generalizzata nel suinetto in svezzamento e nel post-svezzamento è un reperto comune ed eziologicamente anonimo, la cui interpretazione diagnostica necessita di un approccio metodologico strumentale basato sullo studio morfologico delle popolazioni cellulari.
È importante sottolineare come l'approccio citodiagnostico, nell'interpretazione delle lesioni linfonodali rilevate in sede autoptica, può consentire al patologo una diagnosi conclusiva in un numero elevato di casi, consentendo risparmio di tempo nella formulazione della diagnosi ed un minor aggravio di spesa per la stessa.
Lo studio comparato tra esame citologico, istologico e la real time PCR, su linfonodi di suino prelevati durante l'esame necroscopico per sospetto di PMWS, ha permesso di formulare un "grading" delle lesioni ed un raggruppamento di queste in 3 categorie. In questo lavoro è stato possibile dimostrare come i linfonodi inquadrati nel grado III presentino in media un numero significativamente maggiore di copie di acido nucleico virale (Tabella 6).

Tab. 6. Risultati dell'esame citologico, istologico e real time PCR a confronto.
Tab. 6. *Comparison of cytological, histological and real time PCR results.*

N° campione	Grado	Citologia	Istologia	Real time PCR log (copie di ac. nucleico virale)/g
1	0	N	N	N
15	0	NC	N	N
14	1	PMWS	PMWS	7.7
2	2	PMWS	PMWS	7.4
7	2	NC	PMWS	7.9
8	2	NC	PMWS	7.5
9	2	PMWS	PMWS	7.5
16	2	PMWS	PMWS	7.4
3	3	PMWS	PMWS	9.4
4	3	PMWS	PMWS	9.3
5	3	PMWS	PMWS	10.3
6	3	NC	PMWS	10.3
10	3	PMWS	PMWS	10.4
11	3	PMWS	PMWS	7.4
12	3	PMWS	PMWS	9.9
13	3	PMWS	PMWS	9.2
17	3	NC	PMWS	10.3
18	3	PMWS	PMWS	9.3
19	3	PMWS	PMWS	10.6
20	3	PMWS	PMWS	10.5

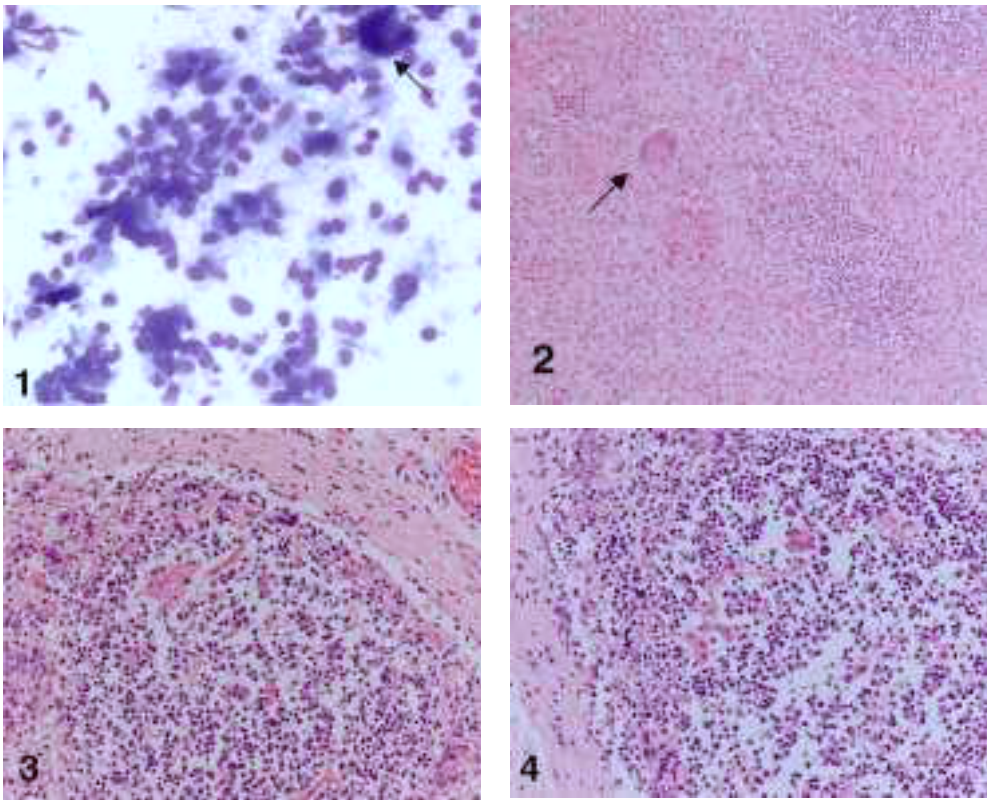


Fig. 1. Impronta linfonodale: popolazione di grandi cellule macrofagico-istiocitarie e presenza di una cellula gigante multinucleata (freccia) (May Grunwald-Giemsa,40X).
Fig. 1. *Lymph node imprint: high number of large macrophage-histiocytic cells and multinucleated giant cell (arrow) (May Grunwald-Giemsa, 40X).*

Fig. 2. Linfonodo: numerose grandi cellule macrofagico-istiocitarie e una cellula gigante multinucleata (freccia) infiltrano il tessuto linfatico (Ematossilina-Eosina, 10X).
Fig. 2. *Lymph node: large macrophage-histiocytic cells and multinucleated giant cell (arrow) infiltrating lymphatic tissue (Ematoxilin-Eosin, 10X).*

Fig. 3 e 4. Linfonodo: grave deplezione linfocitaria e infiltrazione di elementi macrofagico-istiocitari (Ematossilina-Eosina, 20X).
Fig. 3 e 4. *Lymph node: macrophage-histiocytic cells infiltrating a depleted follicle (Ematoxilin-Eosin, 20X).*

La possibilità di stabilire una gradazione cito-istologica, basata sulla gravità delle lesioni, risulta estremamente importante per il significato diagnostico che questa riveste (Sarli G. et al., 2001). Sulla base di queste osservazioni è possibile affermare che il riscontro di quadri citologici linfonodali, classificabili nei gradi II e III, è suggestivo di forme cliniche di PMWS, diagnosticabili quindi senza la necessità di ulteriori approfondimenti diagnostici.
Nel presente lavoro un solo campione è stato classificato nel grado I. In questo gruppo

riteniamo possano rientrare le forme iniziali o sub-cliniche della malattia, nonché casi in via di guarigione. I campioni così inquadrati risultano di non facile interpretazione e devono essere valutati con estrema cautela. Sempre in questo contesto, occorre anche riportare che lievi quadri di deplezione linfocitaria non sono differenziabili morfologicamente da condizioni di semplice inattivazione linfonodale. In questi casi pertanto, la sola valutazione morfologica, basata sull'interpretazione di quadri cito-istologici, riferibili a lieve deplezione linfocitaria, può non essere sufficiente per una diagnosi di PMWS.

I 5 casi che hanno fornito un esito non conclusivo erano caratterizzati da preparati citologici di difficile interpretazione per l'ipocellularità del campione e per la presenza di numerosi "nuclei nudi", essendo stati ottenuti da campioni linfonodali con iniziali fenomeni autolitici. Questo ribadisce la necessità di operare, soprattutto per quanto riguarda la diagnosi citologica, con materiale in ottimo stato di conservazione.

In conclusione, l'impiego dell'esame citologico assume notevole importanza come esame collaterale nella diagnosi di PMWS, considerando anche la possibilità di un suo impiego *intra-vitam*, a partire da materiale prelevato tramite agoaspirazione da linfonodi esplorabili (mandibolari, cervicali, inguinali superficiali e poplitei).

BIBLIOGRAFIA

Allan G., Meehan B., Todd D., Kennedy S., Mc Neilly F., Ellis J., Clark G., Harding J., Espuna E., Botner A., Charreyre C. (1998). "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes", Veterinary Record 142, p.467-468.

Balasch M., Segalés J., Plana-Duran J., Umiza A., Latimer K.S., Domingo M. (1998). "Pathological findings of pigs experimentally inoculated with tissue homogenates from pigs clinically affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome", Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July, p.211.

Brodersen B.W. (1998). "Overview of Post Weaning Multysistemic Wasting Syndrome", George A. Young Swine Conference, p.21-24.

Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Wilson P., Strokappe J., Martin K., Mc Neilly F., Meehan B., Todd D., Haines D. (1998). "Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome", Canadian Veterinary Journal 39, p.44-51.

Harding J.C.S., Clark E.G. (1997). "Recognizing and diagnosing Post-weaning multisystemic wasting syndrome", Swine Health and Production 5, p.201-203.

Harms P.A., Sorden S.D., Halbur P.G., Bolin S.R., Lager K.M., Morozov L., Paul P.S. (2001). "Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus", Vet. Pathol. 38, p.528-539.

Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. (1998). "Porcine circovirus infection in Northern Ireland", Veterinary Record 142, p.495-496.

Kiupel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Clark E.G., Haines D.M. (1998). "Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana", Veterinary Pathology 35, p.303-307.

Luppi A., Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Cantoni A.M., Cabassi E., Corradi A. (2004). "Grading cito-istologico delle lesioni linfonodali in corso di PMWS nel suino", Atti della

Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme, Parma, Italia, 25-26 Marzo 2004, p.477-485.

Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C., Rolla G.L. (1999). "Indagini clinico-patologiche in un focolaio di PMWS (Postweaning Multisystemic Wasting Sindrome) in suini del nord Italia", Large Animals Review 2, p.47-62.

Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Domingo M. (2004). "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs", J. Virol. Methods 117, p.75-80.

Rossow K.D. (1998). "Porcine circovirus: four cases and a historical review", Allen D. Leman Swine Conference p.5-9.

Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcato P.S. (2001). "Immunohistochemical characterization of the limph nodes reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)", Veterinary Immunology and Immunopathology 83, p.53-67.

Segalés J., Domingo M., Balasch M., Plana-Duran J., Latimer K.S., Majò N. (1998a). "Lesions and porcine circovirus genome detection in lymphoid tissues from post-weaning multisystemic wasting sindrome (PMWS) affected pigs", Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July, p.210.

Segalés J., Domingo M., Balasch M., Plana-Duran J., Latimer K.S., Majò N. (1998b). "Lesions and distribution of porcine circovirus genome in the liver from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs", Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July, p.209.