Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS
nel 2009 si svolgono grazie al contributo di:

• BAYER SANITA' ANIMALE
• BOEHRINGER INGELHEIM
• CEVA VETEM
• CHEMIFARMA
• DOX-AL ITALIA
• ELANCO ANIMAL HEALTH
• ESTEVE VETERINARIA
• FATRO
• FORT DODGE ANIMAL HEALTH
• INTERVET/SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH
• JANSSEN-CILAG
• MERIAL ITALIA
• NOVARTIS ANIMAL HEALTH
• PFIZER ANIMAL HEALTH
• TRE I
• VIRBAC

Con il sostegno di:

BANCA POPOLARE DI VERONA
PASSIONE E SENSIBILITÀ PER IL TERRITORIO

e della:

Banca popolare dell'Emilia Romagna
GRUPPO BANCARIO Banca popolare dell'Emilia Romagna

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI **2009**

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

35°

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2009

XXXV MEETING ANNUALE

Modena

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2009

Atti dellla SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini
XXXV Meeting Annuale, Modena, 12-13 Marzo 2009.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale S.p.A. in Parma nel mese di Marzo 2009.

ISBN 978-88-903311-1-4

INDICE

Prefazione ..... pag. 13

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Cremona, 18 aprile 2008

GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO ED EFFICIENZA RIPRODUTTIVA

Conte F. Miglioramenti, errori e inefficienze nei piani alimentari destinati ai riproduttori suini ..... pag. 17

Caleffi A. Come interpretare e utilizzare con profitto i programmi di gestione delle scrofe ..... pag. 32

Kobal F. La fecondazione: gli errori più frequenti ed i possibili interventi correttivi ..... pag. 40

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Caselle di Sommacampagna (VR),10 ottobre 2008

ANTIBIOTICO RESISTENZA. IMPATTO SULLA SALUTE DEL MAIALE E DELL'UOMO

Zaghini A. Meccanismi di acquisizione dell'antibiotico resistenza ..... pag. 50

Battisti A. Il monitoraggio dei batteri antibiotico-resistenti di origine suina e impatto sulla salute pubblica ..... pag. 60

Pontello M. Valutazione dell'antibiotico-resistenza in batteri enteropatogeni da uomo e suino ..... pag. 66

Burch D. Uso razionale degli antibiotici e antibiotico resistenza ..... pag. 89

ATTI DEL XXXV MEETING ANNUALE
Modena, 12-13 marzo 2009

TAVOLA ROTONDA:
GESTIONE DELLA SALA PARTO

Mazzoni C. L'importanza della formazione dell'imprenditore suinicolo, del metodo e della predisposizione nel personale della sala parto per puntare alla maggiore efficienza. Esperienze di campo. ..... pag. 104

Collell M. Punti chiave nel controllo ambientale della sala parto ..... pag. 114

TAVOLA ROTONDA:
ALIMENTAZIONE E PATOLOGIE DELLA SCROFA E DEL SUINETTO IN SALA PARTO

Dell'Orto V. La nutrizione funzionale in sala parto ..... pag. 122

Nigrelli A.D. Enteriti neonatali enzootiche dei suinetti lattanti, con particolare riguardo alle clostridiosi ..... pag. 134

Candotti P., Rota Nodari S. Malattie puerperali, perinatali e sindromi disgalattiche della scrofa ..... pag. 143

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Salvini F., Guadagnini G., Alborali L. - Descrizione di 8 episodi di congiuntivite mucopurulenta in suini all'ingrasso ..... pag. 174

Spaggiari B., Merialdi G. , Bonilauri P., Luppi A., Leonelli R., Bonci M., Sandri G.P., Dottori M., Gozio S., Martelli P. - Griglia S.P.E.S.: valutazione al macello di polmoni appartenenti a partite di suini provenienti da due allevamenti con bassa sieroprevalenza da *Actinobacillus pleuropneumoniae* ..... pag. 180

Fiasconaro M., Aronica V., Rappazzo E., Russo M., Di Marco V. Tubercolosi nel suino Nero dei Nebrodi: valutazione del rischio e studio caso – controllo. ..... pag. 186

Galletti E., Merialdi G., Antonelli A., Brini E., Fusaro L., Sarli G., Fontana M.C., Martelli P. - Su un caso di porpora trombocitopenica isoimmune in suinetti neonati ..... pag. 192

Rota Nodari S., Archetti I., Guerra O., Candotti P. - *I*ntervalli di riferimento di alcuni parametri biochimici in scrofe. ..... pag. 199

Franco A., Merialdi G. , Iurescia M., Feltrin F., Lorenzetti R., Zini M., Ianzano A., Amoruso R., Buccella C., Bassoli O., Cito G., Cuoghi G., De Bassa A., Floriani E., Perrone V., Razzini P., Liuzzo G. e Battisti A. -*Staphylococcus* aureus meticillino-resistente (MRSA): survey al macello su allevamenti suini italiani ..... pag. 208

Magistrali C.F., D'Avino N., Ciuti F., Cucco L., Maresca C., Paniccià M., Petrini S., Scoccia E., Tentellini M., Valli B., Vischi O., Pezzotti G.- Studio longitudinale: rapporto tra stadio del ciclo riproduttivo, numero di parti ed eliminazione fecale di *Salmonella* spp. nelle scrofe. ..... pag. 212

Bosi P., Merialdi G., Bardasi L., Scandurra S., Vecchi M. , Ferro P., Messori S., Nisi I., Casini L., Trevisi P.
Effetto della somministrazione di tre diversi antibiotici sull'ecologia intestinale e su alcuni parametri produttivi di suinetti in svezzamento: dati preliminari. ..... pag. 219

Gradassi M., Sozzi E., Zanoni M., Salogni C., Cordioli P., Alborali L. Il virus influenzale suino (*SIV*) e le principali associazioni virali, batteriche e da *Mycoplasma hyopneumoniae* in 150 episodi di patologia respiratoria nel suino. ..... pag. 229

Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A.D.- Studio preliminare sull'importanza del metodo d'estrazione del DNA per la titolazione di PCV2 con real-time PCR. ..... pag. 243

Luppi A., Bonilauri P., Mazzoni C., Spaggiari B., Maioli G., Leonelli R., Di Lecce R., Borri E., Tonon F., Gradellini S., Ferrari E., Dottori M.- Percorso diagnostico pre e post vaccinazione per PCV2 in un allevamento con PCVAD/PMWS subclinica. ..... pag. 249

Petrini S., Sabbatini M., Silenzi V., Barocci S., Ciuti F., Pezzotti G., Fortunati M., Paniccià M.- Indagini virologiche nei confronti del circovirus suino tipo 2 (PCV2) nel Centro Italia: risultati preliminari. ..... pag. 258

Botta E., Careddu M.E., Massa M., Baricco G.
Indagine sulla granulometria dei mangimi in alcuni allevamenti di suini in provincia di Cuneo. ..... pag. 265

Tarocco C. - La sindrome della prima figliata. ..... pag. 275

Tarantola M., Tomassone L., Ferenaz I., Martano G. - Applicazione di un "rating scale" comportamentale e associazione con il sovraffollamento nell'allevamento suino intensivo: risultati preliminari. ..... pag. 286

Candotti P., Rota Nodari S., Razzuoli E., Dotti S., Amadori M. - Verifica degli effetti flogistici dello svezzamento precoce nel suinetto e loro modulazione mediante somministrazione di interferon-alfa. ..... pag. 293

Gradellini S., Mazzoni C., Bassoli O., Moscardini E., Orlandi G., Gentile L., Ferrari E. - Prevalenza di suini criptorchidi, maschi interi ed ermafroditi al macello e valutazione olfattiva dell'odore di verro. ..... pag. 301

Amedeo S., Cerruti F., Capucchio M.T., Palmerini D., Apicella M., Giberti M., Guarda F., Mioletti S. - Espressione dell'osteopontina in testicoli sani e criptorchidi di suino: risultati preliminari. ..... pag. 308

Archetti I., Rota Nodari S., Guerra O., Candotti P.
Intervalli di riferimento dei parametri emocromocitometrici in suinetti svezzati e scrofe. ..... pag. 314

Borghetti P., Ferrari L., De Angelis E., Morandini L., Pelenc F., Gabaldo G., Bottarelli E., Martelli P. - Valutazione di parametri immunitari in suinetti alimentati con supplementazione a base di fermenti lattici vivi e mannooligosaccaridi con β-glucani. ..... pag. 320

Bozzetta E., Varello K., Musella C., Careddu M.E., Pisoni G., Zuccon F., Madonna R., Montesano M., Faccenda M., Kobal F., Sala V. - Monitoraggio delle infezioni da PCV2 negli allevamenti piemontesi: dalla diagnosi alla caratterizzazione dei fenotipi istologici. ..... pag. 330

Caleffi A. - Esperienza di campo sull'impiego di tulatromicina nel controllo della malattia di Glässer del maiale. ..... pag. 340

Candotti P., Rota Nodari S. - Ricostruzione chirugica funzionale in scrofa colpita da morsicatura della vulva durante la lattazione. ..... pag. 345

Candotti P., Guizzardi F., Rota Nodari S., Guerzoni S., Turci S. - Somministrazione di paglia mediante *dispenser* in suini a coda lunga e a coda corta: valutazione del cannibalismo della coda e delle orecchie. ..... pag. 350

Cevidalli A.E., Bongiovanni E., Bosetti M. - Efficacia di una premiscela per alimenti medicamentosi, a base di florfenicolo (Nuflor®) in comparazione a una premiscela di controllo, nel trattamento della Malattia Respiratoria Suina. ..... pag. 360

De Mateo Aznar M., Ceglie L., Carnieletto P., Bortoletto G., Rossetto G., Drigo M., Nardelli S. - Dinamica sierologica dell'infezione da *PRRSV* e *mycoplasma hyopneumoniae* in un gruppo di scrofette di un'azienda da riproduzione. ..... pag. 373

Di Marco V., Marianelli C., Cifani N., Aronica V., Fiasconaro M., Russo M., Amedeo S., Catalano D., Guarda F., Capucchio M.T. - Il suino Nero dei Nebrodi quale possibile serbatoio della tubercolosi all'interno di un'area protetta (Parco dei Nebrodi): esperienze personali in sei anni di sorveglianza (2003-2008). ..... pag. 382

Donna R. - I principi di accreditamento dell'allevamento suino: applicazione del manuale qualita' in una azienda a ciclo chiuso. ..... pag. 392

Ferrari L., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P. - Identificazione di fenotipo linfocitario citotossico e produzione di interferone-γ mediante marcatura intracelluare nel suino. ..... pag. 398

Ferro P. - Utilizzo di un test di campo per la ricerca di *Lawsonia intracellularis* da feci suine. Risultati preliminari. ..... pag. 409

*Frangione S., Di Teodoro G., Fascianella D., De Marzi R., Marruchella G.*Un episodio di vaiolo del suino: rilievi anatomo-istopatologici. ..... pag. 413

Gaidella L., Cantoni C.- Il Piano Nazionale per il benessere animale in allevamento. ..... pag. 417

Marruchella G., Giacominelli-Stuffler R., Baffoni M., Granito G., Maccarrone M. - Espressione della 5-lipossigenasi (5-lox) e della cicloossigenasi-2 (cox-2) in corso di pneumopatie infiammatorie del suino: indagini preliminari. ..... pag. 422

Martano G., Fedele V., Rigano R.- Monitoraggio della sieropositività e del titolo anticorpale per il virus della Malattia di Aujeszky in allevamenti suini da ingrasso e da riproduzione. ..... pag. 427

Martinelli N., Luppi A., Lelli D., Sozzi E., Canelli E., Moreno Martin A.M., Fontana R., Lavazza A., Lombardi G.F. - Prevalenza di anticorpi anti-hev in allevamenti suini del Nord Italia. ..... pag. 431

Merialdi G., Fontana M.C., Tallarico N., Turci S., Leonelli R., Galletti G., Vincenzi E., Rugna G., Bonilauri P. - Effetto della somministrazione in fase pre-macellazione di una fonte di acido formico e acido citrico protetto (Formyl®) sulla prevalenza di suini portatori di *Salmonella* spp. al macello. pag. 437

Nigrelli A.D., Vantini F., Camoni C., Casappa P. - Valutazione dell'attività in condizioni di campo di due medicazioni in alimento a base di amminosidina e apramicina sulla diarrea da *e.coli* (*e.coli* enterotossici) dopo lo svezzamento. pag. 444

Nigrelli A.D., Vantini F., Camoni C., Casappa P.- Valutazione dell'efficacia di due medicazioni in acqua di bevanda a base di amminosidina e di gentamicina sulla diarrea da ETEC (*e.coli* enterotossici) dopo lo svezzamento. pag. 449

Perrone V., Busi M., Ingrosso S., Cito G., D'Amelio S. - Cysticercus tenuicollis in suini macellati normalmente. pag. 455

Perrone V., Cito. G., Cocumelli C. - Linfosarcoma multicentrico in un suino. pag. 459

Sabaté Elías D., Salichs Florensa M., Bosch Riera J., Homedes Beguer J. - Efficacia della somministrazione di ketoprofene nella prevenzione della sindrome disgalattica post partum della scrofa (SDPP) in condizioni di campo. pag. 464

Sala V., Gusmara C., Invernizzi F., Gazza C. - Controllo della diffusione di *Actinobacillus pleuropneumoniae* sulla linea scrofa-suinetto mediante Marbofloxacine Iniettabile (Marbocyl® 10%). pag. 468

Salichs Florensa M., Coll Masvidal T., Sabaté Elías D., Homedes Beguer J. - Studio dell'efficacia del ketoprofene in soluzione orale, somministrato secondo un nuovo schema terapeutico, come trattamento complementare nel complesso respiratorio del suino (CRS). pag. 477

Scaglione F.E., Grande D., Robetto S., Orusa R., Ferroglio E., Bollo E.- Studio epidemiologico sull'infezione da *Mycobacterium* spp. nei cinghiali della Regione Piemonte. pag. 480

Schwarzer K., Maffezzoli D. - Acidi organici protetti per il controllo della Salmonella nei suini. pag. 486

Sensi M., Moscati L., Battistacci L., Gamboni M., Tinaro M., Trabalza Marinucci M., Cavallucci C. - Influenza di una dieta integrata con semi di lino estrusi su alcuni parametri zootecnici, metabolici ed immunologici in suini all'ingrasso. pag. 490

Terreni M., Caleffi A., Arioli E., Cerati C., Benaglia P., Gamba F., Persico F., Martelli P. - Efficacia della vaccinazione dei suinetti verso PCV2 in allevamenti con Malattia da Circovirus (PCVD). ..... pag. 496

Tittarelli C., Sozzi E., Spaggiari B., Alborali G.Loris, Cordioli P., Lavazza A. - Diagnosi al microscopio elettronico di swinepoxvirus, agente di malattia cutanea sporadica, durante il periodo 2002-2008 nel Nord Italia. ..... pag. 507

Tonon F., Rossetto G., Mazzoni C., Stelletta C. - Relazioni tra lo spessore del lardo dorsale ed alcuni indici riproduttivi di scrofe. ..... pag. 513

Vallino Costassa E., Piovano R., Baricco G. - Effetto di mannano-oligosaccaridi (Biomos™) sulle performances di suinetti in accrescimento alimentati con diete a basso tenore proteico: studio preliminare. ..... pag. 520

Villarreal, I., Jensen J.C.E., Nanjiani I.A., Maes D. - Prevalenza dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* in suini di tre settimane di età in diversi paesi europei. ..... pag. 527

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2009

Martelli F., Di Bartolo I., Inglese N., Caprioli A., Ruggeri F.M., Ostanello F.
L'epatite E (HEV) nei suidi:
epidemiologia, diagnosi e filogenesi ..... pag. 531

PREFAZIONE

Come ormai consuetudine consolidata, il volume degli Atti SIPAS 2009 viene pubblicato in occasione del Meeting Annuale del quale quest'anno si svolge la 35^ edizione. E' un traguardo significativo per la nostra Società. L'età della "maturità piena" viene vissuta in un momento in cui il settore di riferimento, la suinicoltura, si trova ad affrontare uno dei momenti più critici che mai si siano presentati.

La crisi in cui versa il mercato del settore trova la sua genesi non più solo nei bassi prezzi di mercato, situazione che si è costantemente proposta nel tempo anche come peculiarità del comparto (andamenti ondulanti ciclici a frequenza fissa) e che il mondo allevatoriale negli ultimi trenta anni è stato in grado di superare garantendo una costante crescita del settore, quanto negli effetti della compiuta globalizzazione dei mercati e nella crisi economico-finanziaria che sta interessando tutti i settori produttivi e che non sembra risparmiare nemmeno la produzione primaria. Ciò che succede nell'emisfero opposto e, a maggior ragione, in Paesi geograficamente più vicini al nostro è, oggi, fortemente in grado di determinare ripercussioni apprezzabili sull'andamento delle imprese zootecniche. Di conseguenza, se le previsioni sull'andamento del mercato sino a qualche tempo fa venivano formulate sfruttando criteri considerati consolidati (consumi, costi delle materie prime, costi energetici, produzioni nei Paesi esportatori verso il nostro, flussi di mercato) oggi quegli strumenti di previsione non appaiono più così affidabili ed applicabili. In effetti si sono attivati meccanismi assai più complessi e le molteplici variabili che insistono sul comparto mutuano elementi appartenenti non solo al mondo produttivo primario più di pertinenza ma anche al *mare magnum* della finanza mondiale e delle sue imperscrutabili logiche e regole spesso solo invocate.

In questo contesto, anche i Medici Veterinari che operano nel comparto suinicolo e che si propongono oggi sempre più come figure tecniche non solo per l'ambito strettamente sanitario (medico) ma anche quello gestionale, rivolgono attenzione anche a queste dinamiche economico finanziarie che sono in grado di condizionare non solo il presente ma anche il futuro del settore di riferimento e di occupazione professionale.

Con questa sensibilità e per la oggettiva necessità che il Medico Veterinario contribuisca a sostenere la suinicoltura soprattutto in questa fase di transizione a "tinte scure" è necessario che accanto all'esercizio dell'arte medica, che gli è propria per formazione e cultura, accresca la sua conoscenza in ambiti più ampi che abbracciano contesti non squisitamente sanitari ma piuttosto zooeconomici e gestionali-manageriali.

La SIPAS può vantare un ruolo di interlocutore preferenziale del settore suinicolo soprattutto perchè in questi trentacinque anni ha saputo dimostrare, grazie al contributo di tutti, di essere in grado di assolvere alla sua mission di Società Scientifica intuendo le esigenze della suinicoltura e rispondendo con la proposta di eventi di aggiornamento scientifico che hanno contribuito ad accrescere la conoscenza delle problematiche di maggiore attualità o in divenire talvolta anche sapendo anticiparne l'informazione e delineandone linee guida per un approccio più compiuto e razionale.

La gestione dell'ambiente, dell'alimentazione, del personale si propone oggi come elemento di criticità per l'allevamento del maiale non tanto perché vi siano proposte in grado di modificare radicalmente il modo di allevare, quanto per il fatto che, molto spesso, ed in tante situazioni, si è persa la sensibilità per un management che applichi

le buone pratiche di allevamento o si è dimenticato cosa si dovrebbe fare. E' necessario quindi fare un passo indietro e riprendere "dalle basi" alcuni concetti fondamentali che sono stati dimenticati o che, per effetto della deviazione dell'interesse verso altre condizioni o problematiche, sono stati posti in secondo piano, posizione questa che non meritano di occupare per la rilevanza dell'impatto che sono in grado di esercitare sulla produttività dell'allevamento. Seguendo questi principi ispiratori vengono proposte le tavole rotonde caratterizzanti il meeting annuale 2009.

Il volume vede inoltre la pubblicazione delle comunicazioni scientifiche in numero superiore a cinquanta, su argomenti vari di ricerca e sperimentazione così come di contributi pratici, che testimoniano della continuità di interesse verso il confronto nonchè della vivacità culturale che anima la Società. Questo traguardo è inequivocabilmente positivo ed impone un vivo e sincero ringraziamento a tutti coloro che hanno dedicato il loro impegno con la meritoria intenzione di contribuire al trasferimento delle conoscenze. E' doveroso, anche quest'anno, così come è avvenuto per la precedente edizione, richiamare l'attenzione degli Autori sulla necessità che il rigore formale dei manoscritti e l'originalità dei contenuti debbano essere mantenuti ed accresciuti al fine di conservare una forte connotazione qualitativa e non solo quantitativa. Ai contributi sperimentali dei Soci la SIPAS riserva particolare attenzione per la loro insostituibile funzione, non solo finalizzata all'applicazione pratica ma anche come supporto all'evoluzione della cultura ed allo sviluppo dell'intera suinicoltura, con quella assunzione di responsabilità che spetta propriamente ad una Società Scientifica e che la differenzia da altre aggregazioni.

Questo volume contiene anche il testo del lavoro che ha meritato l'attribuzione del Premio Guadagnini giunto alla sua decima edizione. E' questa l'occasione per ricordare il compianto Dott. PierFilippo Guadagnini del quale ricorre quest'anno il decennale della scomparsa. Il ricordo dell'uomo, dell'amico, del medico veterinario e del ricercatore che tanto sforzo ha profuso per la crescita della suinicoltura nazionale, e della nostra Società in particolare, è sicuramente ancora vivo nei tanti che l'hanno conosciuto e che hanno avuto la fortuna di apprezzarne le doti. A Lui vorrei dedicare questo volume.

L'occasione è opportuna per esprimere un sincero ringraziamento alle Industrie Salute Animale che hanno accordato fiducia alla Società e reso possibile, anche attraverso il sostegno finanziario, la realizzazione più compiuta di tutte le iniziative promosse, nonché a tutti i Relatori che, con competenza e preparazione, hanno collaborato in modo significativo a far progredire la nostra Società e a rendere possibile il perseguimento degli obiettivi statutari accrescendo le conoscenze scientifiche dei Soci.

Un ringraziamento particolare al Consiglio Direttivo che con disponibilità e impegno è stato artefice dei successi conseguiti e a New Team per la competenza professionale e per la fattiva collaborazione.

A tutti Voi, cari Soci, l'augurio di una proficua lettura, fiducioso che vogliate continuare a rivolgere attenzione alla vostra Società che avete fatto crescere e maturare.

Modena, 12 marzo 2009

Il Presidente
Paolo Martelli

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SIPAS

GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO ED EFFICIENZA RIPRODUTTIVA

Cremona 18 aprile 2008

MIGLIORAMENTI, ERRORI E INEFFICIENZE NEI PIANI ALIMENTARI DESTINATI AI RIPRODUTTORI SUINI

FABRIZIO CONTE
Responsabile Tecnico Fa.Ma.Vit

Gli allevatori di suini si trovano ad affrontare enormi sfide per restare competitivi in un settore sempre più specializzato, costretti ad operare con costi alimentari in continuo aumento e limitazioni relative all'ambiente (vedi normative riguardanti nitrati e fosforo) e al benessere animale (dal 1 gennaio 2003 per le nuove aziende, e dal 1 gennaio 2013 per tutte, l'allevamento delle scrofe in gestazione deve avvenire obbligatoriamente in gruppo per il periodo che va dalla 4° settimana dopo la fecondazione e fino a una settimana prima del parto.)
In questa situazione diventa fondamentale al fine di massimizzare il guadagno del proprio allevamento di suini riproduttori tenere sotto controllo alcuni parametri quali:

- La prolificità del proprio parco scrofe
- Il numero di suinetti svezzati per anno per scrofa
- Il peso di ciascun suinetto sia alla nascita che al momento dello svezzamento (peso della nidiata allo svezzamento)

per valutare correttamente l'efficienza dei propri piani alimentari .

Il programma di alimentazione scelto sarà fondamentale per la redditività del proprio allevamento.
Per questo è importante partire con un piano alimentare corretto fin dalle prime fasi di vita della futura scrofa.

Fino a 25-30 Kg di peso vivo non sussistono particolari esigenze che differenziano gli alimenti destinati a suini da ingrasso o da riproduzione.
La somministrazione dell'alimento scelto per questa fase dovrebbe avvenire a volontà.
Dopo i 30 Kg di peso vivo non è più consigliabile un alimento destinato a suini all'ingrasso di pari peso e pari età, non tanto per le caratteristiche nutrizionali, quanto piuttosto perché iniziano fin da ora a differenziarsi alcune esigenze quali le integrazioni minerali di Calcio e Fosforo e di vitamine quali Biotina (Vit. H) e Vit. E.
In particolare le attuali indicazioni per le scrofette in accrescimento prevedono valori di calcio e fosforo superiori al 25-30% rispetto a quelli previsti per i suini destinati all'ingrasso, mantenendo sempre calcio e fosforo in rapporto di 1,2 / 1, mentre per le restanti integrazioni è consigliabile, anche per opportunità di costo, non eccedere con altri macro e micro minerali; i valori suggeriti e consigliati dalla letteratura per suini all'ingrasso sono sufficienti.
Sovradosaggi di tali additivi sia sugli indici zootecnici che su possibili problematiche a carico dell'apparato scheletrico e articolare sono risultati inutili.
Oltre ai maggiori valori di calcio e fosforo nella scrofetta in accrescimento sarà importante avere apporti di vitamina E superiori a 50mg/Kg di mangime e Biotina superiori a 0,3mg/Kg.
Per le restanti vitamine i valori consigliati per il suino all'ingrasso saranno adeguati (NRC, 1998).

Il piano alimentare della scrofetta deve promuovere uno sviluppo armonico dei vari apparati in particolare dell'apparato scheletrico degli arti che dovranno essere robusti. Riproduttori con danni podali difficilmente raggiungeranno una buona efficienza riproduttiva, spesso saranno riformati prima di raggiungere il picco riproduttivo causando non poche perdite economiche

Si eviteranno in questo modo percentuali elevate di animali riformati per debolezza degli arti imputabili a disturbi dei processi di ossificazione.

Nell'accrescimento della scrofetta restrizioni alimentari (pari al 20%del fabbisogno) tra i 70 e i 175 giorni di età influenzeranno negativamente lo sviluppo della mammella che al termine della gestazione potrebbe avere un peso inferiore al normale. Farmer (2004) ha osservato che carenze energetiche durante il periodo prepuberale possono limitare lo sviluppo del parenchima mammario, dove crescono e si ramificano i dotti mammari, del 26% e soprattutto di quello extra parenchimale del 42%, compromettendo la crescita e il corretto sviluppo del tessuto mammario.

Gli effetti saranno più evidenti se si razionano le scrofette dai 90 giorni di età fino all'inizio della pubertà (Sørensen 2002)

Uno sviluppo corretto dal punto di vista fisiologico è essenziale per conseguire la produttività e la longevità richiesta alla scrofa.

Dalla letteratura si ricava che a 125 – 160 giorni di età le scrofette più pesanti saranno anche quelle che, al momento della maturità, evidenzieranno un maggior tasso di ovulazione e manifesteranno un'alta percentuale di sopravvivenza embrionale. Le scrofette che presentano alti tassi di crescita e pesi più elevati al momento della copertura saranno soggetti potenzialmente più prolifici. La combinazione di età, peso e rapporto grasso/magro (che è indice per valutare lo stato grasso/magro della scrofetta) sembra il parametro più adeguato per decidere il momento migliore per la copertura.

La prima copertura è individuabile in un periodo posto tra i 210 e i 240 giorni di vita. Mediamente si copre la scrofetta tra i 130-140 Kg di peso, al secondo o terzo calore.

Questo risultato si raggiunge alimentando la scrofetta con un mangime che permetta una crescita di 620-630 grammi al giorno dal momento della nascita (o di 750 grammi al giorno considerando solo il periodo di accrescimento che parte dai 30 kg. di peso vivo –Tab. 1)

Tabella 1. Specifiche nutrizionali per scrofette in accrescimento

	30-60 kg	60-100 kg		30-60 kg	60-100 kg
Proteina grezza %	16,5 – 17,5	16 – 17	Triptofano %	0,21	0,20
Grassi greggi %	4 – 4,5	4 – 4,5	Treonina %	0,72	0,66
Fibra grezza %	4 – 4,5	4 – 4,5	Biotina, mg/kg	> 0,30	> 0,30
En. Digeribile, kcal/kg	3400	3300	Vit. E, mg/kg	> 50	> 50
En. Metabolizzabile, kcal/kg	3250	3160	Ca %	1	0,85
Lisina %	1	0,90	P (disponibile) %	0,40	0,35
Metionina %	0,30	0,25	P (totale) %	0,80	0,70
Metionina+ Cistina %	0,66	0,60	Na %	0,25	0,25

Come accennato in precedenza bisognerà ottenere questi sviluppi corporei salvaguardando l'integrità del tessuto scheletrico e promuovendo la precocità sessuale.
Nelle attuali linee genetiche che hanno una gran capacità di deposizione proteica, la crescita della scrofa continua almeno fino al quarto parto, quindi le necessità nutritive per accrescimento, riproduzione e mantenimento della scrofa primipara e secondipara saranno elevate e, data la ancora ridotta capacità di ingestione di questi animali, la condizione corporea al momento della prima copertura risulterà essenziale per soddisfare queste necessità. In questi casi si consiglia la copertura al 3°- 4° calore.
La longevità riproduttiva della scrofa non dipende dall'anticipo della prima copertura, ma dalla adozione di pratiche alimentari e di allevamento che riducano lo scadimento delle condizioni corporee soprattutto durante la prima lattazione.

Può succedere, infatti, che le scrofette giungano alla pubertà e vengano coperte anche a un'età più avanzata senza per questo avere raggiunto una condizione corporea ottimale. Questo renderà necessaria una eccessiva mobilizzazione ed utilizzo dei tessuti materni durante la prima lattazione, la scrofa primipara andrà incontro a una consistente perdita di peso e questo influenzerà negativamente la sua carriera riproduttiva.

Per la scrofetta si è considerato finora il peso, l'età, il numero di calori, ma non si è ancora esaminato **lo spessore minimo che il grasso dorsale** (indice che stima lo stato delle riserve energetiche e con buona approssimazione la condizione corporea) dovrebbe avere al momento della copertura. Dopo anni di raccomandazioni sulla misurazione del grasso dorsale anche sulle scrofette ci si è resi conto che **questo dato al momento del primo accoppiamento** (spessore minimo del grasso dorsale in P2 di 18-20 mm) **ha un'incidenza trascurabile sulle prestazioni dei primi 3-4 cicli riproduttivi.**
Pare infatti che lo spessore del grasso dorsale sia poco correlato con il peso vivo al primo salto, così come le variazioni di peso vivo dalla pubertà fino al 3°- 4° ciclo riproduttivo. Infatti in questa fase (scrofetta) la condizione corporea è stimata più correttamente dal peso vivo e le riserve critiche sono quelle proteiche (massa muscolare) e non quelle energetiche (tessuto adiposo). Per la scrofetta primipara è più importante considerare la massa muscolare, in quanto dopo il parto dovrà sopportare una produzione di latte molto vicina a quella di una scrofa pluripara e non potrà fare affidamento sulla capacità di ingestione e sulle riserve corporee di una scrofa ormai adulta.

Tabella 2. Specifiche nutrizionali indicative per scrofette dai 100 kg alla copertura

Proteina grezza %	15 – 17
Grassi greggi %	5 – 6
Fibra grezza %	4 – 4,5
Energia Digeribile, kcal/kg	3200
Energia Metabolizzabile, kcal/kg	3070
Lisina %	0,75
P totale %	0,70
Biotina mg/kg	> 0,30
Vit. E mg/kg	> 40

Se per una scrofa adulta il declino produttivo inizia quando la perdita di massa corporea raggiunge il 10-12%, per la scrofetta interviene molto prima (6-8% del proprio peso), soprattutto per l'incapacità di quest'ultima a sopperire con un incremento dell'ingestione dell'alimento alla perdita di peso.
Se la perdita di peso sarà eccessiva la scrofa primipara andrà incontro ad una riduzione delle performance riproduttive e di allattamento.
Quando la scrofa primipara è troppo magra o sottoalimentata le proteine che derivano dalle riserve muscolari non soddisfano il profilo aminoacidico necessario alla ghiandola mammaria per la sintesi del latte e per le sue funzioni fisiologiche. Se poi la scrofa continua a sottoalimentarsi o le viene somministrata una razione non adeguata, la produzione di latte tende a diminuire.
Un altro obiettivo minimo da perseguire è quello che la scrofetta subito dopo il parto non abbia un peso inferiore a 175-185 Kg per preservarla da un eccessivo impoverimento delle riserve corporee. Una scrofa primipara di peso corretto godrà di una maggiore protezione nei confronti di problemi quali: minor produzione di latte, una crescita della nidiata rallentata, e una riduzione delle performance riproduttive successive allo svezzamento, quali un intervallo di interparto più lungo, una minore sopravvivenza embrionale con nidiate meno numerose al parto successivo.

Tabella 3. Razionamento indicativo e apporti giornalieri di energia metabolizzabile e lisina in scrofette in accrescimento

Peso vivo kg	Kg mangime/dì	E.M. kcal/ dì	Lisina gr/dì	Lisina (%)
25	1	3185	10	1 %
50	1,6	5095	16	1 %
75	2,3	7325	21	0,91 %
100	2,6	8280	23	0,85 %

ACCRESCIMENTO A PARTIRE DALLE DUE SETTIMANE PRECEDENTI LA 1° FECONDAZIONE

Obbiettivo: massimizzare il tasso di ovulazione e di conseguenza il numero di nati potenziali della prima nidiata

La pratica del *"flushing"* alimentare (incremento dell'apporto energetico che corrisponde a circa 2,5 volte il fabbisogno di mantenimento) durante le due settimane che precedono la prima copertura, è suggerita in primipare che ricevono una alimentazione razionata durante l'accrescimento. Infatti la riduzione di oltre il 50% dell'alimento somministrato ad libitum produce effetti negativi sul tasso di ovulazione nel 1° e nel 2° calore. Si è osservato che un dimagramento eccessivo o un peso non adeguato della scrofetta possono determinare picchi di LH preovulatori ridotti, per frequenza e ampiezza, rispetto alla norma con conseguente riduzione dello sviluppo follicolare e produzione di popolazioni di oociti in basso numero e di scarsa qualità.
Nelle scrofette il flushing aumenta il tasso di ovulazione (in genere si osserva un aumento di 2-3 embrioni) attraverso l'aumento del tasso di insulina.

L'insulina va ad agire in due modi:

1. Centralmente sull'ipotalamo (asse ipotalamo-ipofisario) favorendo la produzione di gnRH, con conseguente aumento della secrezione e concentrazione sierica e tissutale di LH e FSH (gonadotropine)
2. Localmente a livello ovarico sullo sviluppo follicolare e questo in maniera indipendente dalle variazioni di LH, producendo un migliore tasso di ovulazione.

Con la pratica del *flushing* attuato nei 14 giorni che precedono la copertura si sono rilevati elevati livelli ematici di insulina che si accompagnano ad una maggiore sincronizzazione della maturazione delle popolazioni follicolari.

Tabella 4. Piano alimentare riassuntivo per le scrofette durante il ciclo riproduttivo

Fase	Quantità Kg	Tipo di mangime
Fino a 30 kg di p.v.	Ad libitum	In base alla fase
Da 30 a 60 Kg di p.v.	1,6 – 1,8	In base alla fase
Da 60 a 100 Kg di p.v.	2,3 – 2,6	In base alla fase
Da 100 Kg di p.v.	2,6 – 2,8	In base alla fase
Flushing Da 2 settimane prima fino alla copertura	3 – 3,2	In base alla fase

GESTAZIONE

Obbiettivo: per la scrofa primipara fornire un alimento in grado di soddisfare le richieste di:

- Mantenimento
- Crescita dei feti
- Accrescimento materno

Per la scrofa pluripara bisogna inoltre tenere presente la assoluta necessità di:

- Ricostituire le perdite dovute alla precedente lattazione

Durante la gestazione si riconoscono 3 fasi importanti:

1. Annidamento in utero degli ovuli fecondati (circa prime tre settimane)
2. Sviluppo e crescita nei feti del tessuto muscolare, recupero del peso e delle con dizioni corporee da parte della scrofa. (da 21 a 75 giorni circa)
3. Accrescimento fetale (da 70-75 giorni fino al parto) e strutturazione della ghiandola mammaria in cui il tessuto adiposo viene sostituito da quello lobulo alveolare preposto alla secrezione lattea.

Alimentazione della scrofa in gestazione:

1° fase: dal momento della copertura fino a 21 giorni di gestazione circa, si deve porre attenzione al fatto che un elevato apporto energetico potrebbe causare un aumento della mortalità embrionale. Il meccanismo proposto da Foxcroft (1992) per spiegare questo fatto risiede nell'aumento del flusso sanguigno rilevato a livello epatico in presenza di razioni con elevati tenori energetici (Jindal et all., 1996).

Ciò provocherebbe indirettamente una accelerazione del metabolismo degli ormoni steroidei. Tale fenomeno risulta più evidente nelle scrofette dove la concentrazione plasmatica di progesterone dipende dall'equilibrio tra la sintesi luteinica dell'ormone e la sua eliminazione da parte del fegato e del rene. Studi più recenti riferiscono che il periodo critico per ridurre al minimo i rischi di mancato annidamento o di riassorbimento embrionale può limitarsi ai primi 3 giorni dopo la copertura, pertanto sarebbe necessario ridurre a meno di 2 Kg/giorno il consumo alimentare solo per le prime 72 ore, e iniziare poi ad aumentare gradualmente il consumo fino a raggiungere 2,5 – 2,8 Kg / giorno di mangime in funzione delle condizioni corporee della scrofa.

2° fase: dal 21° al 75° giorno di gestazione la scrofa ha la possibilità di ricostituire le riserve corporee, perdute durante la precedente lattazione.

In questo periodo, inoltre, può essere migliorato lo sviluppo fetale dei suinetti in particolare l'aumento del numero di fibre muscolari e migliorando il rapporto tra fibre muscolari primarie e secondarie. In tal modo si potrà agire anche sul peso che il suinetto avrà dopo la nascita: infatti tale peso è in funzione del numero di fibre muscolari di ciascun animale e quindi tante più fibre muscolari avrà un suinetto, tanto maggiore sarà la sua capacità potenziale di crescita (Lefaucheur et all. 2003). Dopo la nascita l'aumento di peso avverrà in funzione dell'aumento di volume delle fibre muscolari che rimarranno numericamente stabili per tutta la vita.

Questi obbiettivi prevedono un razionamento da 2,5 a 3 Kg / giorno di mangime in funzione delle condizioni corporee della scrofa.

3° fase: dal 75° giorno di gestazione in poi le necessità energetiche e i fabbisogni della scrofa sono in forte aumento.

Tra il 75° e il 90° giorno di gravidanza si ha normalmente il maggiore sviluppo della mammella e questo è molto importante perché la futura capacità di produrre latte dipende anche dal numero di cellule secretorie che si sviluppano nel parenchima mammario proprio in questo periodo. E' ormai un dato consolidato che elevati apporti nutritivi potrebbero portare ad infiltrazioni di grasso a livello mammario a scapito quindi dello sviluppo del tessuto ghiandolare riducendo la produzione nella successiva lattazione. Andrebbe quindi mantenuto un quantitativo di alimento pari a 2,5 – 3 Kg /giorno di mangime. In questo periodo bisogna evitare un eccessivo ingrassamento. Dopo il 90° giorno di gestazione però aumentano fortemente le necessità nutrizionali della scrofa sia per il rapido accrescimento fetale (due terzi della crescita fetale avvengono in questo periodo) sia per i maggiori fabbisogni di mantenimento della scrofa dovuti all'aumento di peso complessivo. Aumentando la somministrazione di mangime di circa 0.8-1.0 Kg/ giorno fino ad arrivare in totale a 3,3 – 3,5 Kg / giorno, si può favorire l'incremento di peso dei suinetti alla nascita anche di 40 grammi, che possono corrispondere ad una differenza di 170 grammi a 3 settimane di età. (Tab. 5)

Tabella 5. Specifiche nutrizionali indicative per scrofe in gestazione fino a 3-4 giorni dal parto

Proteina grezza %	13,5 – 14,5	Triptofano %	0,1
Grassi greggi %	4 – 4,5	Treonina %	0,3
Fibra grezza %	5,5	Biotina, mg/kg	> 0,2
En. Digeribile, kcal/ kg	3100	Vit. E , mg/kg	> 50
En. Metabolizzabile kcal/kg	2950	Ca %	0,8 – 0,9
Lisina %	0,6	P (disponibile) %	0,35 – 0,5
Metionina %	0,2	P (totale) %	0,6 – 0,7
Metionina+Cistina %	0,35	Na %	0,2

D'altra parte però i potenziali vantaggi dell'aumento del consumo di mangime durante l'ultima fase della gestazione devono essere valutati attentamente in relazione al possibile effetto negativo che ciò potrà avere sull'appetito e sulla capacità di ingestione durante la successiva lattazione. Infatti un eccessivo apporto energetico, potrà indurre un maggior deposito di grasso con il rischio di avere scrofe troppo grasse al momento del parto. Ciò potrebbe determinare un minor consumo di alimento durante l'inizio della lattazione con conseguente perdita eccessiva di peso e prolungamento dell'intervallo svezzamento – estro.
Un modo per avere una buona capacità di ingestione fin dall'inizio della lattazione, senza avere scrofe troppo grasse, consiste nel distribuire durante la gestazione un mangime sufficientemente fibroso: l'animale sarà così in grado di assumere un volume notevole di alimento, e, una accorta gestione dei piani alimentari, potrà variare il livello energetico della razione a seconda delle necessità senza per questo interferire con le capacità di ingestione.

FIBRA

Possiamo definire la fibra in diversi modi:
chimicamente la fibra grezza (dato espresso con il metodo Weende), che è il dato riportato sul cartellino di un mangime, non è in grado di differenziare in modo chiaro una materia prima dall'altra. Una definizione biochimica è più precisa e ha forse una maggior valenza da un punto di vista alimentare.
Biochimicamente la fibra si divide in 5 grandi classi: 1 classe **solubile in acqua** e 4 classi **insolubili in acqua** formate da Pectina, Emicellulosa, Cellulosa e Lignina (Gidenne, 2001). Tali fibre sono polimeri vegetali composti principalmente da catene glucidiche, non vengono idrolizzate da enzimi endogeni, ma solo dalla flora batterica intestinale del ceco e del colon.
Le fibre insolubili in acqua possono definirsi anche come fibre alimentari e dietetiche.
Da un punto di vista fisiologico la fibra dietetica è in grado di influenzare aspetti direttamente correlati con la digestione: può condizionare il tempo di transito dell'alimento nel tratto intestinale aumentandone la velocità nella porzione superiore e rallentandola in quella inferiore. Se aumenta il tempo di permanenza dell'alimento nel grosso intestino si ha un maggior sviluppo della microflora batterica in grado di ricavare energia dalla fibra alimentare mediante la produzione di Acidi Grassi Volatili.
Un'altra funzione che si può attribuire alla fibra dietetica è quella di tipo meccanico. Ha un'influenza positiva sul benessere del suino: gli alimenti fibrosi determinano una sensazione di sazietà precoce dovuta alla dilatazione delle pareti dello stomaco e agli impulsi nervosi inviati dallo stomaco al sistema nervoso centrale, e promuovono una regolare azione peristaltica evitando il verificarsi di possibili costipazioni. Anche la legislazione europea, da noi recepita con il DL n° 53/2004, stabilisce norme minime sulla protezione del suino e dice all'articolo 2, punto 7: «Per calmare la fame e tenuto conto del bisogno di masticare, tutte le scrofe e le scrofette asciutte gravide devono ricevere mangime riempitivo o ricco di fibre in quantità sufficiente…»
Ma quali materie prime fibrose usare?
Un altro indice per valutare l'efficienza delle materie prime fibrose è la capacità che hanno di trattenere e assorbire acqua (Tab. 6).

Tabella 6. Fibre alimentari in alcune materie prime

FIBRE ALIMENTARI						
	Erba medica	Crusca di frumento	Polpe di bietola	Buccette di soia	Polpe di cicoria	Fibra funzionale (lignecellulosa)
Fibra grezza %	26	8,5	21	32,5	18,5	67,5
Pectine % NSC1 – (amido+zucccheri)	11	0,5	24	21	24	0
Emicellulose % (NDF2 – ADF3)	15	26	20	9,5	17	15
Cellulose % (ADF – ADL)	25	10	19	36	19	50
Lignina % (ADL)	7,5	2,5	2	2	2	25
Capacità di trattenere l'acqua	2 – 3	1 – 2	5 – 6	2 – 3	6 – 8	8 – 10

1) NSC = Carboidrati Non Strutturati 2) NDF = Fibra Neutro Detersa 3) ADF = Fibra Acido Detersa

FIBRE ALIMENTARI

Nelle formulazioni aziendali dove si usano poche materie prime essenziali (cereali - farine di soia -cruscami) e un nucleo più o meno ristretto, difficilmente si ottengono razioni sufficientemente fibrose. Si raggiunge il 4 - 4,5% di fibra grezza impiegando quantità elevate di cruscami.
Meglio quindi utilizzare ingredienti che abbiano un maggior apporto di fibre alimentari quali pectine ed emicellulose da cui si possono ottenere anche apporti energetici in base alla produzione di Acidi Grassi Volatili (Holt et all., 2006).

A partire da tre quattro giorni prima del parto è poi opportuno impiegare un mangime cosiddetto **PERI-PARTO**, da somministrare al momento dell'ingresso in sala parto e per i 2-3 giorni dopo il parto. Questo mangime particolarmente ricco di fibre (7-9%) sarà in grado di creare un sufficiente volume di ingombro anche se somministrato in quantità ridotte (Guillemet et all., 2006).

Tabella 7. Specifiche nutrizionali indicative per scrofe da 3-4 giorni prima del parto fino a 2-3 giorni dopo

Proteina grezza %	14	Triptofano %	0,10
Grassi greggi %	**4,5**	**Treonina %**	**0,30**
Fibra grezza %	>7,5	Biotina, mg/kg	> 0,20
En. Digeribile, kcal/ kg	**2900**	**Vit. E , mg/kg**	**> 50**
En. Metabolizzabile kcal/kg	2780	Ca %	0,8 – 0,9
Lisina %	**0,70**	**P (disponibile) %**	**0,35 – 0,5**
Metionina %	0,20	P (totale) %	0,6 – 0,7
Metionina+Cistina %	**0,35**	**Na %**	**0,20**

Infatti in prossimità del parto la scrofa riduce fortemente l'ingestione anche a causa dell'ingombro fisico dato dal volume dell'utero gravido nella cavità addominale, fino a sospendere completamente l'assunzione di cibo il giorno stesso del parto

Da quanto detto fin qui risulta chiaro che il razionamento durante la gravidanza va studiato in base allo "stato di condizione corporea e allo stato di nutrizione" della scrofa.
Come valutarlo?
Certamente l'osservazione degli animali(Body Condition Score - BCS), e quindi l'esperienza, sono fondamentali per avere una rapida idea della correttezza di un piano alimentare e sia gli allevatori che i tecnici sanno che esiste una stretta relazione tra lo stato di nutrizione e la fertilità per cui obesità oppure magrezza al momento del parto influenzano negativamente i parametri produttivi e riproduttivi.
Infatti le **scrofe** che giungono al parto **troppo grasse** (BCS = 5) possono presentare problemi come: aumento dei parti distocici, malessere generalizzato con febbre, ipogalassia, scoli vaginali purulenti, incapacità a rialzarsi. Tutto questo influirà negativamente sulla quantità di alimento ingerito sia per la riduzione del numero dei pasti, sia per il quantitativo medio assunto per pasto. Di conseguenza il massiccio ricorso alle riserve corporee annullerà completamente il maggior peso raggiunto al momento dell'ingresso in sala parto
D'altro canto **scrofe troppo magre** (BCS =1) per poter sostenere lo sforzo energetico dovuto alla produzione del latte, possono perdere peso a tal punto da ridursi in un stato di nutrizione scadente che potrà compromettere la ripresa del ciclo sessuale.
Risulta quindi fondamentale valutare correttamente lo stato di nutrizione della scrofa per evitare condizioni estreme.

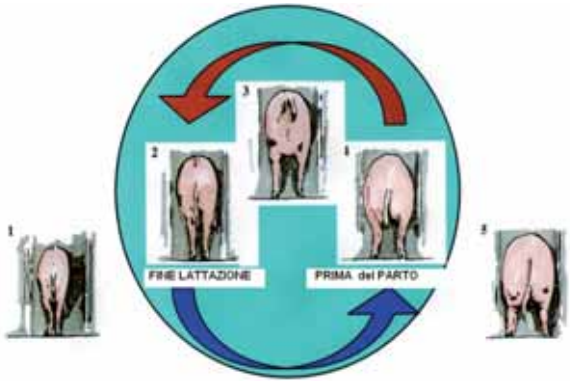


Fig. 1. *Punteggi di BCS nella scrofa in gestazione e lattazione*

Valutare la scrofa con il solo punteggio di condizione corporea però non indica le vere riserve corporee dell'animale: capita infatti che si possa attribuire punteggi di 3 con spessori di grasso dorsale molto variabili
Per questo motivo il **BCS** andrebbe associato alla **misurazione del grasso dorsale** nel punto P2 (misurato a 6 cm lateralmente alla colonna vertebrale in corrispondenza dell'ultima costola.) Questo controllo aggiuntivo potrà essere ripetuto più volte durante la gravidanza e anche in sala parto e permetterà di evitare i casi di eccessiva obesità o magrezza dell'animale.

Con BCS e spessore del grasso dorsale è possibile ottenere quindi un dato indicativo sulle riserve energetiche della scrofa, ma non conosciamo quali siano le riserve proteiche, ovvero la massa muscolare, e non siamo in grado di attribuire un fabbisogno di crescita alla scrofa che come già detto con l'utilizzo delle genetiche attuali ha una crescita e quindi una deposizione proteica che prosegue fino al 4° parto circa.
Per questo motivo si dovranno aggiungere ai 2 precedenti parametri di valutazione anche quello del **peso vivo** dell'animale.
Proprio il peso vivo permette di valutare il fabbisogno di mantenimento (circa 75% del fabbisogno energetico nel periodo di gestazione) e quantificare l'incremento di peso che potrà essere realizzato in gestazione considerando anche il numero di parti già effettuati. L'obbiettivo è quello di non portare al parto una scrofa troppo grassa che potrebbe mangiare meno dopo il parto, perdendo ulteriormente peso e compromettendo quindi il ciclo riproduttivo seguente.

LATTAZIONE

Lo scopo è quello di limitare e contenere le perdite (depositi di grasso e masse muscolare) della scrofa che allatta e contemporaneamente massimizzare la produzione lattea per ottimizzare la crescita dei suinetti.
Le scrofe molto prolifiche e che hanno una elevata produzione lattea, quasi inevitabilmente sono incapaci di consumare quantità elevate di mangime; in questi casi sfrutteranno parte delle proprie riserve per mantenere la produzione lattea elevata.
Dopo il parto la produzione di latte diventa prioritaria rispetto a tutte le altre funzioni fisiologiche: il 70-80% dei fabbisogni energetici e il 90 % dei fabbisogni aminoacidici vengono destinati alla funzionalità della mammella.
Per far fronte a richieste così elevate è necessario che la dieta sia in grado di fornire il maggior quantitativo di nutrienti altrimenti la scrofa, come spesso accade, sarà costretta a utilizzare le proprie riserve corporee andando incontro a una condizione di bilancio energetico e proteico negativo che inevitabilmente si ripercuoterà sul successivo ciclo riproduttivo. Poiché l'alimento anche se ben formulato e bilanciato è sempre insufficiente a coprire i fabbisogni di inizio lattazione, succede che in un primo momento vengano impiegate le riserve adipose e poi in un secondo momento vengano utilizzate le riserve muscolari con conseguenti severe perdite di peso
Il ricorso alle proprie riserve corporee può comportare un differente fabbisogno di aminoacidi.
Si è visto che può essere diversa la perdita di peso della scrofa se la produzione di latte e le attività metaboliche sono soddisfatte da aminoacidi di origine alimentare o se questi derivano invece da un catabolismo proteico delle proprie riserve. Un punto particolarmente critico è la valutazione del fabbisogno di Lisina che aumenta progressivamente in corrispondenza dell'aumento della capacità di produzione lattea e della prolificità (numero di nati per nidiata) (Jones et all. 1999). Date le capacità produttive e riproduttive odierne, i fabbisogni di Lisina raccomandati sono di 55-60 grammi al giorno, con l'accorgimento però di moderare l'inclusione di Lisina di sintesi.

Tabella 8. Specifiche nutrizionali indicative per scrofe in lattazione

Proteina grezza %	17 – 18,5	Triptofano %	0,2
Grassi greggi %	5,8	Treonina %	0,685
Fibra grezza %	> 5	Biotina, mg/kg	> 0,2
En. Digeribile, kcal/ kg	3360	Vit. E , mg/kg	> 75
En. Metabolizzabile kcal/kg	3160	Ca %	0,9 – 1
Lisina %	0,9	P (disponibile) %	0,5
Metionina %	0,25	P (totale) %	0,75
Metionina+Cistina %	0,625	Na %	0,25

Infatti è sempre meglio avere valori proteici di origine alimentare elevati per apportare anche altri aminoacidi in modo da avere e mantenere il più possibile un corretto rapporto tra gli stessi (Dourmad et all., 2005).
Eccessive perdite di peso in lattazione sono associate sia a problemi a breve termine (aumento dei tempi di interparto con allungamento dell'intervallo svezzamento-estro e una riduzione del numero dei nati al parto seguente se vengono superati i 4-5 giorni) e a lungo termine con un maggiore numero di scrofe riformate. Pertanto sarà necessario in questa fase cercare di massimizzare il consumo alimentare, allevando la scrofa ad una temperatura ottimale (temperatura ideale compresa trai i 20 e i 25 gradi) e passare dopo alcuni giorni dall'inizio della lattazione (max. 1 settimana) alla somministrazione di 3 pasti al giorno, meglio ancora se effettuata a bagnato. Rispetto all'alimentazione a secco è possibile aumentare il consumo di mangime del 25% (Sardi et all., 1993)
Questo problema è particolarmente sentito nelle primipare in quanto sono animali ancora in fase di crescita corporea e con capacità di ingestione ancora limitate.
Le principali fonti energetiche provenienti dall'alimento che la scrofa può utilizzare sono rappresentate dai grassi e dagli amidi.
La grassatura della dieta può già avvenire nell'ultima parte della gestazione con il mangime peri-parto e nel corso della lattazione; si è visto che elevati livelli di grasso danno generalmente un miglioramento delle caratteristiche qualitative del latte (aumenta la sua densità energetica). In questo modo è possibile migliorare la sopravvivenza dei suinetti nati sotto peso (inferiore a 1 kg di peso vivo) . Il tipo di grasso utilizzato con la dieta è in grado di influenzare e modificare sia la quantità di latte prodotta che la quantità di grasso presente nel latte. I migliori risultati sono stati ottenuti grassando l'alimento con grassi animali (Lauridsen et all., 2004).
Se l'utilizzo dei grassi consente di aumentare la densità energetica del latte, l'impiego di energia fornita da amidi (principali precursori del lattosio nel latte di scrofa), permette di ottenere un latte più bilanciato da un punto di vista nutritivo,ciò favorisce l'ipertrofia muscolare in quanto viene migliorato il rapporto proteina/energia del latte stesso, migliorando di conseguenza l'accrescimento ponderale medio giornaliero del suinetto. (Jones et all., 2002)
In questo modo si potranno privilegiare nel mangime per scrofe in lattazione in una prima fase (i primi 10 giorni di lattazione) apporti energetici provenienti da grassi e in una seconda fase (per 11-18 giorni) apporti energetici da amidi.

Anche durante la lattazione è fondamentale tenere sotto controllo lo stato di nutrizione della scrofa: l'obbiettivo da prefissarsi è quello di avere dopo la lattazione animali che non abbiano perso troppo peso (contenuti entro i 10 kg…). Se si valuta l'indice BCS le scrofe non dovrebbero avere un punteggio a fine lattazione inferiore a 2,5; se si valuta le spessore del grasso dorsale, le perdite in sala parto dovrebbero essere contenute entro i 4 mm, per cui risulta ancora una volta importante la valutazione precisa dei parametri della scrofa in ingresso e in uscita dalla sala parto per poter impostare un piano alimentare in grado di ridurre al minimo le perdite.
Se la scrofa si troverà in condizioni normali alla fine della lattazione tornerà in calore regolarmente al 4° - 5° giorno e il calore sarà maggiormente fertile. Se l'animale andrà invece in calore dopo il 6° giorno la fertilità calerà raggiungendo il minimo al 10° giorno.

Tabella 9. Piano alimentare riassuntivo per le scrofe durante il ciclo riproduttivo

Fase	Quantità kg	Tipo di mangime
Gestazione Dalla copertura al 3° giorno dopo	1,8 – 2	Gestazione
Gestazione dal 3° al 21° giorno	2,5 – 3	Gestazione
Gestazione dal 21° al 90° giorno Per recupero condizione corporea	2,5 – 3 secondo BCS	Gestazione
Gestazione dal 90° al 110° giorno	3,3 – 3,5	Gestazione
Da 4 giorni prima del parto a 3 giorni dopo il parto	2 – 2,5	Peri-parto
Allattamento da 3 giorni fino allo svezzamento	Ad libitum	Allattamento
Intervallo svezzamento calore	Ad libitum	Allattamento

Il miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive si può ottenere oltre che con una buona genetica e con un'alimentazione corretta ed equilibrata sia in gestazione che in lattazione, anche con utilizzo mirato di alcuni additivi.

Vit. A e Vit. E : protezione nei confronti di micotossine (Cabassi et all., 2003) con una probabile azione di tipo detossificante.
Autori danesi (Lauridsen et all., 2005) hanno verificato che somministrare in lattazione 250 ppm di vitamina E aumenta la concentrazione di Immunoglobuline nel latte: suinetti infettati sperimentalmente con E.Coli hanno avuto un indice di sopravvivenza maggiore se provenivano da scrofe che avevano assunto più vitamina E

Vit. B 12 e Acido Folico: possono influenzare lo sviluppo e la sopravvivenza embrionale, se somministrate in dosi 10 volte superiori ai normali fabbisogni. In questo caso è necessario valutare l'integrazione in termini di costo-beneficio.

L-Carnitina: è un additivo vitamino-simile coinvolto nel metabolismo energetico ed è essenziale nell'utilizzo degli acidi grassi come produttori di energia (trasporto degli acidi grassi ai siti di β ossidazione).
Ricercatori tedeschi (Birkenfeld et all., 2006) hanno dimostrato sperimentalmente che scrofette e scrofe gestanti alimentate con diete contenenti L-Carnitina in dosi di 125 mg/capo/giorno, partoriscono nidiate più numerose (in media 0,4 suinetti in più per parto) e più pesanti al momento dello svezzamento rispetto agli animali di controllo. I suinetti alla nascita sono infatti più

vitali e vigorosi e per questo sono in grado di succhiare il latte dalla madre con maggiore frequenza e maggiore intensità. Ciò induce una maggiore produzione di latte da parte della scrofa che sarà quindi in grado di alimentare sempre meglio, in termini di quantità, i piccoli già dal terzo giorno di vita per arrivare ad avere suinetti di peso significativamente superiore al 14 giorno rispetto agli animali di controllo. In questo modo si è riusciti a incrementare il peso dei suinetti al momento dello svezzamento.

CONCLUSIONI

Da quanto fin qui esposto risulta evidente che un "ottimo piano alimentare" sarà tanto più efficace quanto sarà "personalizzato". Dovrà tenere in conto dello stato di nutrizione della singola scrofetta, della singola scrofa per tutto il periodo di gestazione e di lattazione al fine di ridurre al minimo il periodo di interparto e per ottenere un maggior numero di suinetti svezzati con un elevato peso corporeo, cosa che si rifletterà sulle performance produttive dei futuri animali da carne.

Bibliografia

DECRETO LEGISLATIVO 20 FEBBRAIO 2004, N. 53 "Attuazione della direttiva n. 2001/93/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini", *Gazzetta Ufficiale* n. 49 del 28 febbraio 2004 - Supplemento Ordinario n. 30

N.R.C., *Nutrient requirements of swine, tenth revised edition*, 1998, National Accademy Press, Washington D.C.

BIRKENFELD C., KLUGE H., EDER K., *L-Carnitine supplementation of sows during pregnancy improves the suckling behaviour of their offspring,* Brit. Jour. Nutr. , 2006, 96, p. 334-342.

CABASSI E., MIDURI F., LOMBARDI G., LOSIO M.N., FUSARI A., CORRADI *A, Aflatossicosi indotta e risposta immunitaria in scrofe gravide: effetti della supplementazione con vitamina A e vitamina E*, Atti XXIX Meeting S.I.P.A.S., Salsomaggiore Terme, 27-28 marzo 2003.

DOURMAD J.Y., ETIENNE M., NOBLET J., VALANCOGNE A., DUBOIS S., VAN MILGEN J., *InraPorc: un outil d'aide à la dé decision pour l'alimentation des truies riproductrices*, 2005, Journées Recherche Porcine, 37, p. 299-306.

FARMER C., PETITCLERC D., SØRENSEN M.T., VIGNOLA M., DOURMAD J.Y., *Impacts of dietary protein level and feed restriction during prepuberty on mammogenesis in gilts.*, 2004, J. Anim. Sci., 82, p.2343-2351.

FOXCROFT G.R., *Nutritional and lactational regulation of fertility in sows.,* 1992, J.Reprod. Fertil., suppl. 45, p.113-125.

GIDENNE T., *Besoins en fibres et sécurité digestive du lapin en croissance*, 2001, Cunicolture, n°157 – 28, p.7-10.

GUILLEMET R., HAMARD A., QUESNEL H., PERE M.C., ETIENNE M., DOURMAD J.Y., MEUNIER-SALAÜN M.C., *Comportement alimentaire et performances de reproduction chez la truie en lactaion: impact d'un aliment fibreux pendant la gestation*, 2006, Journées Recherche Porcine, 38, p. 453-460.

HOLT J.P., JONSTON L.J., BAIDOO S.K., SHURSUN G. C., Effect of a high-fiber *diet and frequent feeding on behaviour, riproductive performance, and nutrient digestibility in gestating sows*, 2006, J. Anim. Sci., 84, p. 946-955.

JINDAL R., COSGROVE J.R., AHERNE F.X,, FOXCROFT G.R, Effect of nutri-*tion on embryonal mortality in gilts: association with progesterone,* 1996, J Anim Sci., 74, p.620-624.

JONES D.B., STAHLY T.S., *Impact of amino acid nutrition during lactation on body nutrient mobilization and milk nutrient output in primiparous sows*, 1999, J. Anim. Sci., 77, p. 1513-1522.

JONES G. M., EDWARDS S.A., SINCLAIR A.G., GEBBIE F.E., ROOKE J.A., JAGGER S., HOSTE S., *The effect of maize starch or soya-bean oil as energy souces in lactation on sow and piglet performance in association with sow metabolic state around peak lactation*, 2002, Anim. Scie., 75, p. 57-66.

LAURIDSEN C., DANIELSEN V., Lactational dietary fat levels and sources influence *milk composition and performance of sows and their progeny,* 2004, Liv. Prod. Sci., p. 95-105.

LAURIDSEN C., JENSEN S.K., *Influence of supplementation of all-rac-alfa-tocopheryl acetate preweaning and vitamn C postweaning on alfa-tocopherol and immune responses of piglets*, 2005, J. Anim. Sci., 83, p. 1274-1286.

LEFAUCHEUR L, ECOLAN P, BARZIC YM, MARION J, LE DIVIDICH J., *Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle*, 2003, J. Nutr., 133, p. 140-147.

SARDI L., MARTELLI G., PARISINI P., *Esperienze sugli effetti dell'alimentazione liquida nell'allevamento della scrofa in lattazione*, 1993, Rivista di Suinicultura, 34, p. 57-59.

SØRENSEN M.T., SEJERSEN K., PURUP S., *Mammary gland development in gilts*, 2002, Liv. Prod. Sci., 75, p. 143-148.

Virbac
SALUTE ANIMALE

NUOVA ICC

Una sola **passione** : la salute animale

COME INTERPRETARE E UTILIZARE CON PROFITTO I PROGRAMMI DI GESTIONE SCROFE

PROFITABLE USE AND CORRECT INTERPRETATION OF SOFTWARES FOR SOW MANAGEMENT

ANTONIO CALEFFI
Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano

Parole chiave: raccolta dati, target, limite d'azione, punti critici
Key words: harvest dates, target, action limits, stings critical

Riassunto: L'obbiettivo di questo lavoro vuole essere di stimolo per le aziende che ancora non hanno introdotto sistemi computerizzati per l'elaborazione dei dati a farlo, e per quelle che invece hanno già fatto questa scelta una fonte di valori sui parametri produttivi con cui confrontare il proprio livello di efficienza produttiva. Il lavoro analizza alcuni di quei parametri che sono da considerarsi tra i più importanti per valutare l'efficienza produttiva, tra i quali troviamo: svezzati/scrofa /anno, parti/scrofa/anno, svezzati per parto, portata al parto, giorni improduttivi, composizione dei ritorni, percentuale di rimonta, demografia, intervallo svezzamento copertura, nati totali-vivi-morti, flusso. Per ciascuno di questi aspetti si cerca di proporre dei valori chiamati target che sono da considerarsi un obbiettivo e dei valori soglia che siano da considerarsi il *limite d'azione* oltre o al di sotto del quale dovremo assolutamente intervenire.

Summary. The aim of this study is to promote the introduction of computerized systems for data processing in pig farms that do not used them, and to provide those that already adopted these systems with a source of values of productive parameters to be compared and evaluate their productive efficiency level. Some key parameters for productive efficiency evaluation are considered, as: weaned pigs/sow/year, number of farrows/sow/year, weaned pigs/farrow, farrowing rate, unproductive days, repeated breeds classification, replacement rate, demography, mate to weaning interval, total born piglets – alive – dead, flow. For each of these aspects the authors suggest target values to be considered as an objective, and borderline values that must be considered as action limits; over or below them corrective actions are necessary.

INTRODUZIONE

In ogni attività economica, quindi compreso l'allevamento del suino la conoscenza della propria efficienza produttiva risulta essere una necessità assoluta per poter comprendere se in quello che si sta' facendo tutto procede nel migliore dei modi o se invece ci sono carenze o margini di miglioramento, ecco che il principio mentale che deve spingerci ad avere una perfetta conoscenza delle nostre capacità o incapacità produttive è il seguente **"COME POSSO DECIDERE DOVE DEVO**

ANDARE SE NON SO DOVE SONO". Solo in questo modo potremo quindi decidere di intervenire la dove esistono i maggiori punti critici, consentendo così di raggiungere in modo più semplice ed efficace quei risultati che un'azienda ben condotta deve essere in grado di ottenere. Prima però di cominciare il discorso dei parametri dell'efficienza produttiva c'è bisogno di parlare di un pre-requisito senza il quale ogni discorso successivo perde completamente il senso, sto parlando della *raccolta dati*, questo aspetto è alla base di tutto in quanto se questo lavoro non viene svolto nel migliore dei modi tutti gli elaborati successivi forniranno indicazioni false che non faranno altro che portarci fuori strada nel momento in cui dovremo intraprendere delle azioni correttive. La raccolta dei dati deve essere fatta da personale che sia ben istruito e formato, per eseguire questa operazione, deve inoltre essere reso conscio che quello che sta facendo è un lavoro vero e proprio e che da questo lavoro dipenderanno decisioni importantissime. Agli operatori che svolgono questa mansione devono essere forniti sistemi di annotazione chiari, semplici e funzionali, e per coloro che poi devono trasferire i dati a computer il caricamento deve essere tempestivo e sistematico, tutto questo è possibile solo se a monte esiste un buon sistema di identificazione degli animali che deve essere permanente, inequivocabile e facilmente leggibile.

MATERIALI E METODI

I programmi di gestione scrofe sono presenti oramai da molti anni sul mercato e tutto sommato non ci sono differenze macroscopiche tra un prodotto e l'altro, l'importante è che siano semplici e veloci dal punto di vista del caricamento dei dati. Per quanto riguarda la semplicità possiamo dire che quelli che girano in ambiente Windows sono solitamente più facili da utilizzare rispetto a quelli in ambiente DOS. Altro aspetto importante resta la possibilità di interfacciarsi con i programmatori del sistema sia per quanto riguarda l'assistenza ma anche per poter richiedere miglioramenti del programma su nostra richiesta specifica. I parametri più importanti che i programmi di gestione sono in grado di fornirci e che andremo ad analizzare sono: *svezzati/scrofa/anno, parti/scrofa/anno, svezzati per parto, portata al parto, giorni improduttivi, composizione dei ritorni, percentuale di rimonta, demografia, intervallo svezzamento copertura, nati totali/vivi/morti, flusso*. Prima di scendere nei dettagli di questi parametri voglio descrivere i due termini che d'ora in avanti ricorreranno spesso nella descrizione cioè il target che altro non è che il valore a cui l'azienda deve puntare per quel parametro, e il limite d'azione che rappresenta il limite di accettabilità per quel parametro oltre o al di sotto del quale dovremo tassativamente intervenire per riportare l'efficienza aziendale entro i limiti di accettabilità. Mi preme inoltre ricordare che non stiamo parlando di valori assoluti ma di risultati a cui si deve puntare e pertanto una volta raggiunti si dovrà nel limite della fisiologia spostare i target un po' più in alto.

Svezzati/scrofa/anno, è il parametro più importante che un programma di gestione dati possa fornirci in quanto abbina i dati della gestione riproduttiva con quelli della gestione parti, in pratica ogni programma esegue questo calcolo dividendo il nume-

ro totale degli svezzati nel corso dell'anno con il numero delle scrofe mediamente presenti in allevamento nel corso dell'anno, questo dato non è sempre confrontabile se eseguito da programmi diversi per via di un diverso modo di conteggiare il numero delle scrofe mediamente presenti e soprattutto per il diverso modo in cui il programma decide da quando una scrofetta è da considerarsi scrofa (concetto della scrofa produttiva). Il target per questo parametro è di **24.5** s/s/a, dato possibile da ottenersi in tutte le tipologie di allevamento, ma nel caso che si stia valutando un'azienda sito 1, quindi con la sola presenza delle scrofe il target deve essere spostato più in alto a **26** s/s/a. A proposito di questo parametro possiamo con buona equivalenza affiancare il concetto dei kg. di svezzati per scrofa per anno che in pratica esprime la stessa cosa del numero di s/s/a ma con una maggiore valenza al riguardo dell'efficienza economica nella gestione delle scrofe, per questo parametro l'obbiettivo target è di **200** kg. di suinetti svezzati per scrofa per anno. Il limite d'azione per gli s/s/a è da considerarsi tale per un valore al di sotto di **20**. In pratica possiamo anche dire che il numero degli s/s/a sono il frutto del numero di parti scrofa anno per il numero medio degli svezzati per parto, per stabilire quindi quali azioni intraprendere nel caso che ci trovassimo sotto il target dovremo verificare se il mancato raggiungimento di quel valore è dovuto a uno solo dei due parametri o come più probabile ad entrambi, ovviamente al fine di ottenere più facilmente il risultato dovremo lavorare maggiormente sul parametro che più si allontana dal valore target.

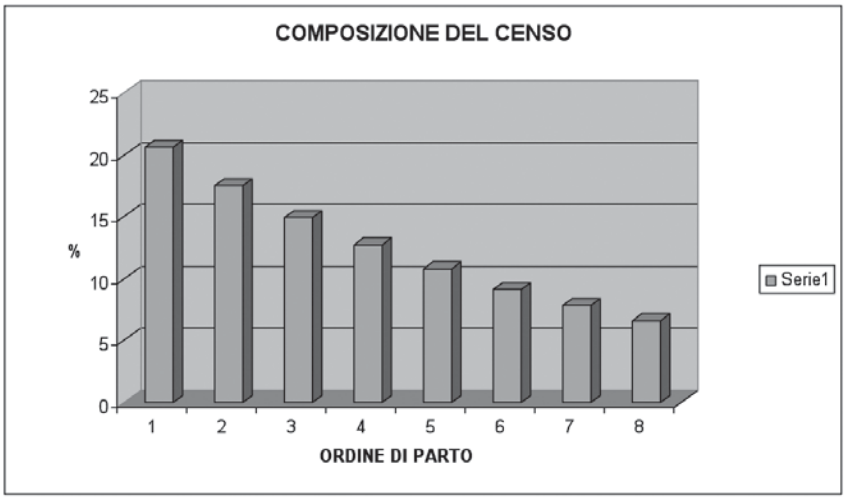
Parti/scrofa/anno, è il parametro che più di ogni altro misura la capacità di un'azienda di far funzionare bene il reparto copertura/gestazione cioè l'efficienza riproduttiva. I programmi di gestione scrofe possono, a seconda della scelta fatta dal programmatore, calcolare questo parametro in due modi diversi il primo facendo numero parti/presenza media scrofe/periodo*365 oppure 365/interparto. Il target per questo parametro è di **2.4** p/s/a, mentre il limite d'azione è di **2.2**. Nel caso fossimo al di sotto del limite d'azione dovremo mettere in atto tutti gli interventi che andranno a ridurre i giorni improduttivi in quanto questo farebbe aumentare i p/s/a, in pratica dovremo puntare a ridurre il numero dei ritorni, l'intervallo svezzamento calore, gli anaestri, gli aborti.

Svezzati per parto, il valore espresso in questo caso misura la capacità di gestire la sala parto e viene calcolato semplicemente dal numero dei suinetti svezzati/il numero delle nidiate svezzate (partorite). Il target di **10.2** è l'obbiettivo da raggiungere, mentre per il limite d'azione **9.5** può essere considerato il valore soglia al di sotto del quale dobbiamo pensare ad azioni correttive, e quali sono in questo caso i punti su cui lavorare, probabilmente l'introduzione dei parti indotti e quindi assistiti, la formazione degli operatori della sala parto, la gestione delle adozioni e dei baliaggi, l'introduzione di genetiche iperprolifiche, la qualità degli ambienti, la qualità delle gabbie parto, la gestione del microclima in sala parto.

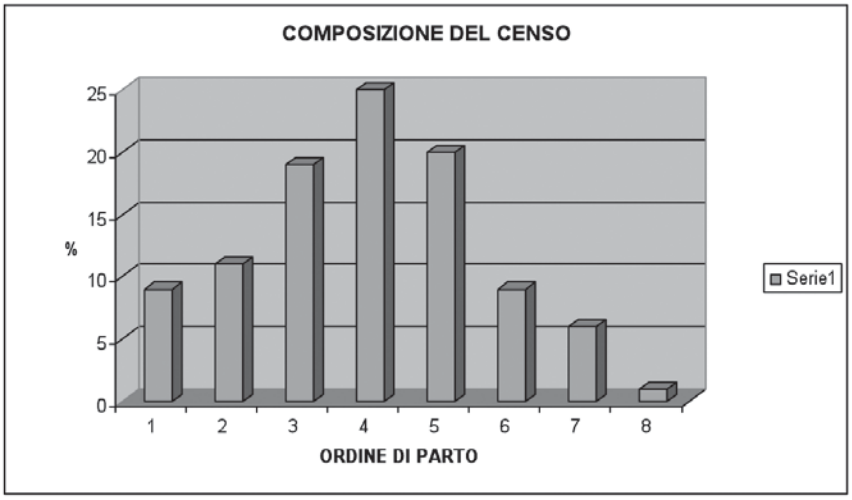
Portata al parto, valore espresso in percentuale ottenuta rapportando il numero dei parti rispetto al numero delle coperture effettuate, questo parametro è importantissimo per valutare l'efficienza della gestione scrofe dalla copertura sino al parto. Alcuni programmi di gestione danno un indice cosiddetto aggiustato in quanto nel calcolo vengono eliminate le coperture delle scrofe coperte ma riformate gravide. Questo è il più classico dei parametri temporali cioè che valuta un evento in questo

caso il parto rispetto ad un'azione svolta tempo prima sugli stessi animali cioè la fecondazione. La portata al parto esprime in un solo dato l'insieme degli effetti dei ritorni, delle scrofe vuote al parto, degli aborti, della mortalità delle scrofe, e dell'eliminazione delle gravide. Un valore di **86%** è da considerarsi il target di un allevamento con una buona gestione, mentre per il limite d'azione **78%** è da considerarsi un valore sotto il quale si rende indispensabile identificare quali sono i punti critici responsabili di questa situazione al fine di riportare l'azienda su risultati compatibili con la sopravvivenza economica dell'azienda. Nel caso in cui dovessimo intervenire per migliorare le performance su questo parametro dovremo sfruttare al massimo le informazioni che il nostro programma di gestione sarà in grado di fornirci, dovremo, infatti, analizzare i ritorni sia per quantità che per tipo, quante vuote al parto, quanti aborti e a quale età avvengono, la mortalità delle scrofe o la loro eliminazione da gravide verificandone non solo l'entità numerica ma anche per quali cause, in quale stagione dell'anno, in quale ordine di parto, e in quale fase della gestazione.
Ritorni, si definisce ritorno in calore la ricomparsa dell'estro dopo un intervento fecondativo che non ha dato origine a un parto. L'analisi approfondita della composizione dei ritorni può fornire importantissime informazioni relative agli errori che si compiono nella gestione del reparto copertura/gestazione. I ritorni sono una delle cause principali dell'aumento dei giorni improduttivi e di conseguenza vanno a ridurre la portata al parto e di conseguenza i p/s/a. I programmi di gestione sono in grado di dirci non solo numericamente quanti ritorni abbiamo ma anche e soprattutto di differenziarli in diverse categorie e se esistono differenze tra i diversi ordini di parto. Per interpretare correttamente i ritorni e farne un'analisi approfondita può essere utile un programma di gestione che preveda l'esportazione dei dati in un foglio di calcolo. Anche in questo caso come per la portata al parto ci troviamo di fronte a un parametro temporale, quindi in caso di analisi approfondita dovremo categoricamente prendere in considerazione le coperture che hanno effettivamente dato origine a quei ritorni. I ritorni, in base a una griglia che li differenzia in funzione del numero di giorni trascorsi dal giorno della fecondazione possiamo classificarli come: totali, precoci, ciclici, aciclici e tardivi, in questo modo potremo verificare se ci troviamo di nuovo di fronte alla necessità di un intervento correttivo. IL target dei ritorni è il **13%**, il suo reciproco **87%** sarà la percentuale di scrofe gravide ma non la portata al parto in quanto avremo ancora possibili perdite (vuote al parto, aborti, scrofe eliminate gravide, morte), per il limite d'azione un 18% rappresenta il valore soglia da non oltrepassare se si vuole puntare ad avere almeno il 78% di portata al parto. Nel caso fossimo chiamati ad azioni correttive per questo parametro possiamo dire come criterio generale, che nel caso di valori fuori standard per i ritorni ciclici, soprattutto se con un'elevata percentuale di ciclici di seconda ruota dovremo intervenire sugli operatori e sulle loro scelte operative, mentre nel caso di elevate percentuali di ritorni aciclici dovremo maggiormente considerare i problemi di natura infettiva e o alimentare, senza mai dimenticare comunque che le cause manageriali per il problema ritorni sono di solito in stragrande maggioranza.
Demografia e percentuale di rimonta, sono le due facce della stessa medaglia, infatti, la composizione del censo sarà grandissimamente influenzata dalla quota di rimonta. La corretta demografia è un parametro fondamentale al fine di ottenere un'alta produttività aziendale, serve pertanto una perfetta conoscenza dell'età del parco scrofe.

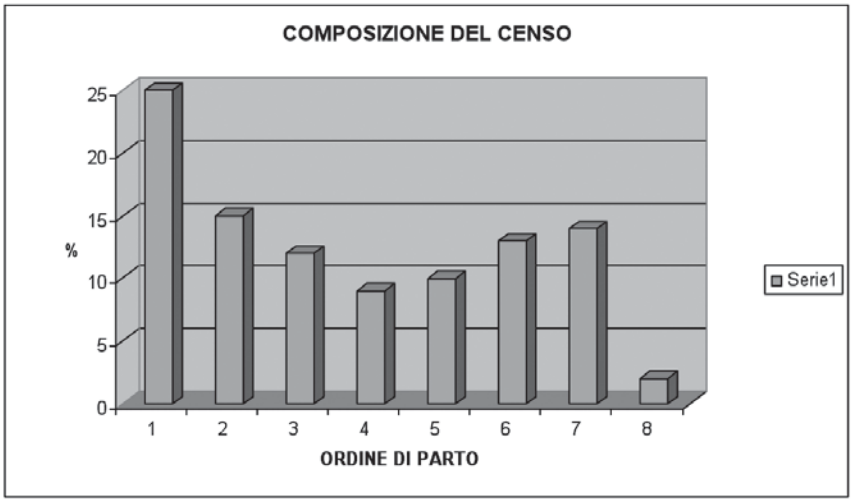
Tutti i programmi di gestione sono in grado di fornirci l'esatta composizione del parco scrofe in funzione della loro età in parti, e facile quindi capire come i programmi di gestione possano permetterci di pianificare le quote di rimonta, inoltre ci permette di comprendere eventuali deficit produttivi legati ad un'errata composizione del censo stesso. Al fine di valutare questo parametro sono molto efficaci i programmi in grado di trasformare i numeri in grafici in modo da renderli immediatamente comprensibili in quanto credo che un grafico valga più di mille parole.



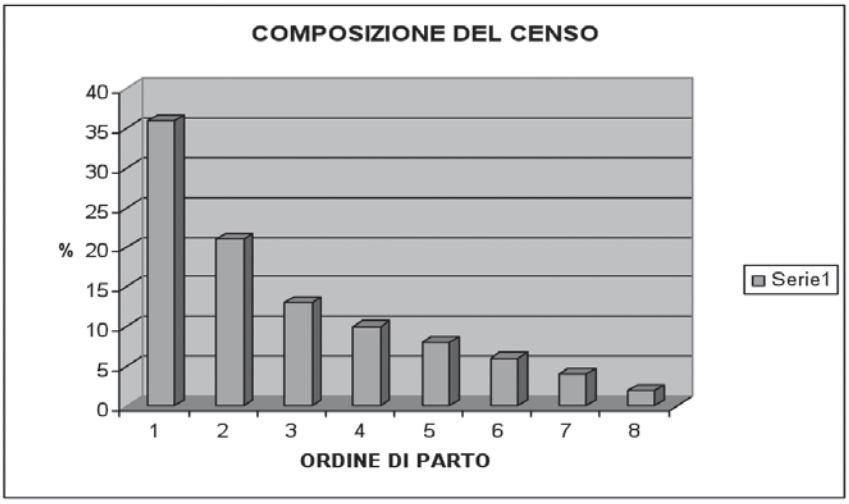
Graf. 1. *Censo ideale, efficienza produttiva stabile.*



Graf. 2. *Censo errato con grande prevalenza di scrofe in apice produttivo, momentanea grande efficienza produttiva.*



Graf. 3. *Censo errato evoluzione del grafico precedente, con alta incidenza di scrofe primipare e a fine carriera, grande deficienza produttiva.*



Graf. 4. *Censo errato con esagerata presenza di primipare probabilmente dovuto ad un eccesso di riforma involontaria dopo il primo parto.*

Quando vogliamo intervenire sulla composizione demografica del nostro parco scrofe il primo criterio da applicare è la scelta dell'ultimo parto utile concetto della riforma volontaria, cosa che dovremo fare sempre osservando i dati che il nostro programma di gestione è in grado di fornirci, quindi il parto di riforma sarà quello

in grado mediamente di offrire una performance inferiore a quello delle primipare. Il target del parto di riforma può essere a seconda delle aziende il **6° o il 7° parto**, il limite d'azione si ha nel caso di valori **inferiori al 5° o superiori al 9°**. Per quanto riguarda la quota di rimonta il target del **35%** si può considerare un valore a cui puntare se siamo in grado di preparare adeguatamente le scrofette ad affrontare l'impatto del primo e secondo parto; mentre il valore sale al **48%** nel caso di una gestione della rimonta più aggressiva che porta comunque a mantenere alta la performance produttiva.

Riforma involontaria, un discorso a parte merita invece il concetto della riforma involontaria cioè di tutte quelle scrofe che vengono riformate per causa di forza maggiore, in sostanza di tutti quegli animali che noi non avremo voluto eliminare ma che abbiamo comunque dovuto eliminare prima del raggiungimento del parto previsto di riforma. Questo parametro è di solito un valore sconosciuto in molte aziende, e l'estrapolazione di questo parametro da un programma di gestione è per adesso da elaborarsi con l'ausilio di un foglio elettronico di calcolo. Il valore target della riforma involontaria è l'**8%** di perdita di scrofe ad ogni passaggio da un ordine di parto al successivo. Dobbiamo però sapere che il passaggio dal 1° parto al 2° e dal 2° al 3° sono sempre di un valore decisamente più alto, il valore del limite d'azione è del **14%**, non è raro trovare allevamenti dove questo dato è decisamente più alto anche del doppio, sino ad arrivare a valori di riforma involontaria tre il 1° e il 2° parto del 35%.

Intervallo svezzamento copertura, per questo parametro possiamo dire che il dato medio non ha un significato rilevante mentre l'osservazione attenta della sua distribuzione percentuale ci fornisce importanti informazioni, il **75%** delle coperture deve avvenire tra il 3° e il 5° giorno post svezzamento, il **90%** entro il 7° giorno, mentre il valore medio aziendale non deve superare i 7/8 giorni di ISC. Se i valori sono molto lontani dai valori target prima riportati bisogna verificare quanti sono gli anaestri (non devono essere superiori al 5% come media annua), e quanti giorni di attesa copertura vengono dati prima di decidere la riforma.

Il flusso, in questo caso non stiamo parlando di un parametro ma di un sistema per migliorare la gestione, in pratica possiamo dire che il flusso è il metronomo delle coperture ed è lo strumento ideale per l'organizzazione del lavoro aziendale nel settore fecondazione. Molti programmi di gestione scrofe sono in grado di mostrarci automaticamente una maschera in grado di riprodurre un cosiddetto tabellone del flusso, facilitando quindi la programmazione delle coperture, che nel caso si decidesse di passare ad un sistema a bande renderebbe tutto più semplice nella fase di trasformazione da un sistema all'altro.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In una suinicoltura moderna l'analisi dei dati aziendali è strumento indispensabile di lavoro, senza le certezze che vengono dagli elaborati dei programmi di gestione in caso di difetti produttivi corriamo l'elevato rischio di intervenire senza cognizione di causa e quindi senza avere la certezza di intervenire sui punti critici cioè la dove con un giusto correttivo avremmo la massima probabilità di ottenere grandi miglioramenti. Dovremo quindi sfruttare tutte le notizie che il nostro programma è in grado di fornirci e non limitarci ad usare esclusivamente le liste utili solo all'organizzazio-

ne del lavoro quotidiano. I programmi di gestione scrofe hanno oramai raggiunto livelli di evoluzione elevatissimi e con ogni probabilità sono oramai maturi i tempi affinché si possano interfacciare i risultati zootecnici con quelli economici, in grado quindi di fornirci informazioni in tempo reale sui costi di produzione. Per chiudere direi che il motto "VINCE CHI SBAGLIA MENO" descrive perfettamente il senso della raccolta dati e della loro interpretazione.

LA FECONDAZIONE : GLI ERRORI PIÙ FREQUENTI ED I POSSIBILI INTERVENTI CORRETTIVI

FRANCO KOBAL

Quando si prende in considerazione l'aspetto della produttività di un azienda suinicola con riproduttori, in genere per la valutazione della sua efficienza si utilizza il dato " suinetti svezzati / scrofa / anno ". E' quanto si può vedere in questo riepilogo, derivato dalla mia esperienza di campo su una ventina di aziende per un totale di poco più di 3300 scrofe.

RIEPILOGO MULTIAZIENDALE PARTI DAL 01/01/07 AL 31/12/07

	P.M.	Rirorni%	Vuote%	Aborti%	Parti%	m.Nv	m.Sv	GGL	ISCU	INTP	PSA	NSA	SSA
CN10	272,19	**11,16**	**12,71**	2,85	71,50	10,31	**9,05**	24,35	8,75	158,06	**2,21**	22,80	**20,02**
CN11	341,19	**7,56**	**9,19**	0,92	79,57	11,10	**10,15**	27,42	11,34	164,36	**2,28**	25,34	**23,16**
CN12	265,36	**7,76**	**9,39**	1,50	78,35	10,35	**9,27**	23,04	14,84	163,30	**2,36**	24,42	**21,86**
CN28	226,96	**11,40**	**3,54**	1,08	82,43	11,76	**10,33**	24,03	11,42	161,13	**2,36**	27,73	**24,34**
CN31	214,83	**20,06**	**8,05**	2,40	68,22	11,65	**10,18**	23,79	11,81	167,58	**2,25**	26,19	**22,89**
CN33	130,30	**16,46**	**11,86**	0,48	68,77	10,60	**9,29**	29,25	15,52	174,38	**2,18**	23,10	**20,25**
CN34	236,34	**5,81**	**15,16**	1,56	74,50	12,66	**11,21**	19,81	14,49	161,65	**2,23**	28,18	**24,94**
CN35	121,53	**12,53**	**11,14**		72,14	11,88	**10,00**	26,50	19,03	171,15	**2,13**	25,33	**21,31**
CN37	183,75	**10,04**	**5,49**	0,38	82,20	10,38	**9,50**	24,33	9,04	157,09	**2,36**	24,52	**22,44**
CN38	149,13	**564**	**7,35**	0,49	83,09	12,47	**10,93**	21,54	12,49	153,68	**2,27**	28,35	**24,84**
CN44	318,76	**11,63**	**7,29**	0,85	77,91	10,78	**9,29**	26,85	12,51	162,58	**2,31**	24,92	**21,48**
CN47	167,67	**7,58**	**18,67**	2,03	68,95	10,50	**9,35**	24,36	11,85	165,89	**2,22**	23,35	**20,81**
CN50	67,31	**13,43**	**5,97**	1,99	77,61	12,48	**10,39**	28,92	9,39	160,46	**2,32**	28,93	**24,08**
CN52	143,72	**13,04**	**8,70**	2,90	71,74	11,94	**10,60**	28,71	15,88	172,61	**2,07**	24,68	**21,90**
CN53	106,63	**7,60**	**21,05**	3,51	67,25	10,05	**9,41**	27,99	16,73	176,66	**2,16**	21,68	**20,29**
CN54	142,81	**7,69**	**12,50**		77,64	9,80	**8,77**	28,20	13,13	166,54	**2,26**	22,16	**19,83**
CN55	273,99	**28,47**	**17,86**	0,79	51,19	10,99	**9,46**	27,98	18,67	183,62	**1,88**	20,70	**17,82**

Mi rendo conto di parlare di numeri piccoli (niente a che vedere con i grandi numeri cui ci stiamo gradatamente abituando), ma siamo di fronte allo spaccato di una realtà zootecnica di piccole e medie aziende, la maggior parte delle quali gestite direttamente dai titolari e senza ausilio di manodopera, che nella provincia in cui opero hanno costituito l'asse portante della suinicoltura locale nella fase di sviluppo.
Analizziamo sommariamente i dati della videata e, senza perderci nei numeri, in questo caso vi invito a porre l'attenzione sulle colonne in grado di darci le percezioni più immediate, vale a dire quelle della "**portata in parto**", dei "**parti/scrofa/anno** ", dei "**nati / scrofa / anno**" e degli "**svezzati/scrofa/anno**".
La scala di valori rappresentati evidenzia differenze pesanti tra le aziende e vi assicuro che nel determinismo di questa situazione solo in pochi casi sono entrati in gioco fattori primari di ordine strettamente sanitario. Un ruolo importante è da attribuire ad errori o cattive pratiche gestionali.

EVOLUZIONE DEGLI INDICI TECNICI DEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI ITALIANI

	2003	2004	2005	2006	2007
INTERPARTO	168	170	168	168	168
PARTI SCROFA/ANNO	2,17	2,15	2,17	2,18	2,17
SUINETTI NATI X PARTO	11,36	11,40	11,69	11,40	11,40
SUINETTI NATI VIVI X PARTO	10,31	10,52	10,60	10,57	10,60
SUINETTI SVEZZATI X PARTO	9,00	0,39	9,47	9,48	9,52
SUINETTI SVEZZATI X SCROFA ANNO	**19,53**	**20,18**	**20,64**	**20,67**	**20,68**

(Fonte: Bollettino C.R.P.A. 2008)

Se vogliamo far riferimento alla situazione nazionale, non abbiamo a disposizione molti lavori; l'unica fonte di una certa consistenza è la tabella contenuta nell'opuscolo pubblicato annualmente dal C.R.P.A. di Reggio Emilia. Per il 2007 esso ha analizzato la produzione di 37000 scrofe mediamente presenti (tra queste sono comprese anche quelle del precedente tabulato).
In questo caso si tratta di valori rappresentati in modo più schematico, espressi come media dei dati forniti, ma che non cambiano il tenore delle mie osservazioni. Uno sguardo veloce alla situazione in alcuni Paesi europei ci indica come in fatto di produzioni ci sia spazio di miglioramento

INDICI TECNICI NEI PRINCIPALI PAESI DELLA COMUNITÀ EUROPEA (2006)

INDICI TECNICI	**UK**	**NL**	**FR**	**DK**	**D**	**I**
Parti / Scrofa / Anno	2,28	2,34	2,26	2,23	2,27	2,18
Suinetti / Nati vivi / Parto	10,90	12,30	12,70	13,50	11,20	10,57
Mortalità presvezzamento	13,3	12,7	14,4	14,1	14,3	10,6
Suinetti svezzati scrofa / Anno	21,36	25,13	24,53	25,86	21,79	20,61

(Fonte: Bollettino C.R.P.A. 2008 su elaborazione MLC)

E questo miglioramento lo si ottiene intervenendo su una molteplicità di fattori che entrano in gioco e che, malgrado tutte le conoscenze, non vengono affrontati in modo corretto. Tra questi un posto di sicura rilevanza è occupato dalla "***fecondazione***".

Proprio per questo l'argomento è sempre di attualità e all'origine della pubblicazione di relazioni, articoli su riviste specializzate,opuscoli, testi.

Per quanto riguarda la mia relazione, senza dubbio non dirò niente di nuovo ma mi limiterò a presentare quanto ho potuto osservare nella pratica quotidiana, con lo scopo di stimolare la capacità critica nei confronti di situazioni problematiche. La regola è "**mai dare niente per scontato**" perchè il più delle volte un'attenta valuta-

zione, sulla base di tutti gli ausili e le informazioni disponibili, permette di evidenziare i problemi in modo tale da poter più facilmente arrivare alla loro soluzione.
Inizio prendendo come riferimento questa tabella, frutto di una ricerca su allevamenti francesi del circuito "Cochons d'or".

STRATEGIE DI RIPRODUZIONE
(Cochons d'or 2006)

Apportando una debita correzione, rappresentata dalla inversione delle colonne 1 e 2, mi pare che essa potrebbe attagliarsi alla nostra suinicoltura.
Ebbene la proiezione di questo grafico mi serve per far notare come, pur nell'evoluzione della tipologia della pratica fecondativa, rivoluzionata dall'applicazione della I.A., non si debba dimenticare che la cosiddetta "***monta naturale***" è ancora in uso.

Fecondazione naturale

In questo caso, se da un lato l'impiego del verro permette di annullare alcuni errori nei quali è facile incorrere con l' I.A., dall'altro è soprattutto alla base di problematiche di natura sanitaria e zootecnica.
Come si è visto dai dati precedentemente esposti, il verro viene impiegato " in monta naturale " anche negli allevamenti impostati prevalentemente sulla I.A.; ma quando ciò accade è in genere perchè si hanno scrofe in calore al di fuori dell'ordinarietà e di conseguenza si tratta il più delle volte della coperturta di soggetti "problema". Alcuni di questi possono presentare infezioni veneree e quindi trasmissibili ad opera del verro; il consiglio è quindi di riservare questi casi a maggior ragione all'I.A.
L'errore zootecnico riguarda invece l'utilizzo di verri di non elevata qualità (sovente soggetti tirati su dal proprio allevamento e non castrati); tenuto conto che in un allevamento che pratica abitualmente la F.A. si può arrivare anche al 15-17% di scrofe coperte in naturale, si capisce benissimo quali possano essere le conseguenze

a livello produttivo (leggasi rese e qualità della carne) per quote di produzione non indifferenti che, anziché discendere da verri frutto di selezione, sono il risultato di accoppiamenti con un " grasso " Ovvie le considerazioni che ne discendono.
Per quell'esigua minoranza di aziende che impiegano solamente la monta naturale rimangono aperte le possibilità di una sottostima del numero di verri indispensabili in base al parco scrofe (ottimale è il rapporto 1 / 20) e di un loro utilizzo non razionale, dove intendo per utilizzo razionale l'impiego di tutti i soggetti a disposizione e non il ricorso solamente a quelli più veloci.

Fecondazione artificiale

Molto più ponderoso è invece il discorso visto sotto la prospettiva della fecondazione eseguita con la tecnica della I.A.
Io ritengo come presupposto che l'atto inseminativo in sé sia di una semplicità infantile; tutte le operazioni che gli stanno attorno costituiscono però dei gradini nei quali è facile inciampare.
In un panorama nel quale la quasi totalità delle aziende utilizza la I.A., sottolineo come l'impostazione mentale del "fai da te", così frequente nelle aziende di piccole e medie dimensioni, ha avuto come conseguenza la nascita di un numero elevato di centri aziendali, molti dei quali improvvisati e quindi privi dei **requisiti minimi** di igiene, necessari per manipolare materiale biologico.
A differenza di quanto accade in realtà suinicole di altre nazioni, l'I.A. in Italia è praticata in oltre l' 80% dei casi a partire da materiale seminale prodotto all'interno dell'allevamento e questo aspetto contribuisce non poco ad ampliare il campo dei possibili errori.
C'è ancora da fare un'altra considerazione: molti allevatori, col conseguimento del diploma di " operatore pratico di I.A. ", si sono confermati nella convinzione di una perfetta padronanza di una materia che, in conseguenza delle sue sfaccettature, è in realtà molto complessa .
E' uno scenario particolare nel quale, nella maggior parte dei casi, l'attore principale è l'allevatore o un suo incaricato ed il veterinario una comparsa che assurge al ruolo di coprotagonista solo nel momento in cui si presentano dei problemi.

Attrezzature

Per quanto riguarda le attrezzature, resta ancora un classico il **microscopio** di bassa qualità o non perfettamente funzionante, che non permette una adeguata valutazione del seme nei suoi aspetti fondamentali di mobilità, vitalità e presenza di forme anomale. Eppure sotto questo aspetto sono in ballo percentuali di fecondità dell'ordine non solo dell'unità ma addirittura delle decine ed espressioni di prolificità anche superiori ad 1 suinetto per parto.
Che dire poi della scarsa attenzione al perfetto funzionamento di apparecchiature quali il **frigotermostato**? Per farla breve, siamo qui in situazioni analoghe a quelle che qualche anno fa un collega, in una sua relazione, aveva evidenziato in seguito al controllo del funzionamento dei frigoriferi deputati allo stoccaggio dei prodotti immunizzanti: molti displays non tarati e di conseguenza temperature interne dell'apparecchio non rispondenti alla richiesta.

Padronanza materiali e metodologie

Le competenze vengono chiamate in ballo quando si deve ragionare di "***mestrui diluitori***"; la gamma di questi prodotti, in relazione alla tipologia (a breve o a lunga conservazione) ed alle ditte produttrici, è molto ampia ma ci sono differenze di efficacia tra l'uno e l'altro. Fin qui niente di particolare in quanto si è nel campo dell'ordinaria concorrenza. Ciò che disarma è invece la non garantita costanza della qualità del singolo prodotto; nel corso della mia attività ho avuto modo di vedere mestrui diluitori modificare di efficacia col cambio di partita, senza che ci fosse una spiegazione plausibile (si tenga presente che le confezioni di questi prodotti a volte non riportano i componenti per cui è difficile venir a conoscenza di eventuali modifiche apportate in fase di produzione). Ciò comporta una costante attenzione e controlli mirati per non essere colti in contropiede.
Un discorso analogo può essere fatto a proposito dei "***guanti***" usati per il prelievo; anche qui, più frequentemente che in passato, ci si trova di fronte ad inconvenienti legati non solo al cambio di prodotto ma addirittura al cambio di partita.
Fortunatamente le conseguenze sulla vitalità del materiale seminale, in un'ipotesi di questo genere, sono immediate e quindi facilmente controllabili al momento della valutazione.

Merita ancora attenzione il problema collegato all'uso di **materiale seminale di bassa qualità**, derivante da soggetti in non perfette condizioni o sottoposti a stress (tipiche sono le modificazioni delle caratteristiche del seme durante il periodo estivo) o dalla conservazione protratta: in questi casi si può star certi che i risultati sono destinati a subire una drastica compromissione, anche se alla valutazione si era stabilito che il prodotto fosse discreto.

Preparativi che precedono l'atto inseminativo

Tralascerei di parlare di fecondazione con seme congelato e di inseminazione post-cervicale, interventi poco praticati a mio avviso nel nostro Paese, per concentrare l'attenzione sui piccoli accorgimenti in grado di migliorare i parametri della riproduzione.
Tra di essi ritengo che ci sia l'adeguato **riscaldamento della dose**, effettuato in modo corretto con la disponibilità di un bagnomaria nel reparto "coperture"; è importante che il materiale seminale, una volta raggiunta la temperatura corporea, non subisca sbalzi termici. Capita invece sovente di assistere a trasferimenti di un consistente numero di dosi, riscaldate in laboratorio, nel locale "coperture" all'interno di contenitori non termostatici; la conseguenza è rappresentata dall'impiego di seme che si è ormai raffreddato al momento dell'uso delle ultime dosi e che in conseguenza dell'inseminazione andrà nuovamente incontro al riscaldamento. Ad una pratica di tal fatta è preferibile l'utilizzo di dosi non riscaldate.
Di estrema importanza è la **detersione delle labbra vulvari**, solitamente imbrattate da materiale fecale, e la successiva disinfezione con prodotti non istolesivi, particolarmente nel caso in cui si utilizzino cateteri con l'estremità a bottone; a differenza di quelli a cavatappi, è difficile introdurli in vagina senza che tocchino

le mucose esterne dell'apparato genitale e di conseguenza non veicolino materiale contaminante, se non si è provveduto ad un' accurata pulizia.

Alloggiamento dei verri

Una particolare situazione a rischio deve poi essere vista nella presenza di verri all'interno della struttura produttiva, perché in questa ipotesi per questi soggetti c'è la possibilità di presentare gli stessi problemi del parco scrofe e di fungere da amplificatori degli stessi, data la mancanza di abitudine a sottoporre il materiale seminale a controlli di ordine sanitario.
Dopo queste osservazioni di ordine generale, passerei alla disamina di uno degli aspetti più gravidi di conseguenze sulla buona riuscita dell'I.A.

Ricerca calori, identificazione del calore e momento dell'inseminazione

Ogni azienda sotto questo punto di vista rappresenta un "unicum", in quanto i fattori che entrano in gioco nel determinismo del calore sono molteplici; su di essi pesa in maniera determinante il tipo di conduzione aziendale, che deve sempre essere volta a massimizzare i risultati.
E' però proprio da questo punto che iniziano i problemi che sono in grado di generare gli effetti più negativi.
La frequente allocazione delle **scrofe in gabbia** dopo lo svezzamento senz'altro non è la soluzione ottimale per gli opportuni rilievi, specie se le capacità intuitive dell'operatore sono di basso profilo. Non è infrequente di conseguenza trovare scrofe, coperte con le compagne di svezzamento, inconfondibilmente in calore dopo alcuni giorni.
La mancata **rilevazione a partire dal giorno stesso dello svezzamento** poi è un altro fattore di insuccesso produttivo, specialmente in questi periodi caratterizzati da un'esasperata necessità di produrre grazie a tecniche quali lo svezzamento frazionato o i baliaggi con primipare. Anche in questi casi sarebbe opportuno calibrare gli interventi sulle reali capacità del personale disponibile.

Già da indagini ecografiche condotte a cavallo degli anni 90 si era potuto osservare che l'ovulazione avviene a circa il 70% del periodo di immobilità della scrofa e che l'intervallo Svezzamento/Calore è inversamente proporzionale a quello Calore / Ovulazione. Se colleghiamo queste indicazioni al risultato di altri studi che indicano la collocazione dell'atto inseminativo tra il momento dell'ovulazione e le 24 ore che lo precedono, si può avere un'idea abbastanza orientativa sul momento ideale per l'intervento.
Nella maggior parte delle razze in condizioni normali la quasi totalità dei calori, nel gruppo " svezzate ", compaiono a partire dal 3° giorno post-svezzamento e si esauriscono in quinta, massimo sesta giornata. Quando ciò si verifica, le manifestazioni dell'animale sono evidentissime e si esauriscono nell'arco di 3-4 giorni. Queste sono osservazioni di massima ma abbastanza indicative, per cui tempistiche diverse devono già sollevare delle perplessità. Il caso più frequente è rappresentato

dalla comparsa di calori tardivi, vale a dire a partire dal 5°- 6°- 7° giorno o addirittura più tardi ed in genere ciò è associato a manifestazioni che si prolungano per diversi giorni, rendendo difficile l'identificazione del momento migliore per l'inseminazione. Meglio che con le parole posso evidenziare questo tipo di problematica con la proiezione di dati tratti da un'azienda che ho avuto modo di seguire.
Come conseguenza diretta in genere si pensa di ovviare con interventi plurimi di I.A., che non permettono mai di ottenere valori di fecondità accettabili. Se il problema non è occasionale ma persistente, si rende necessario un intervento volto a modificare lo stato delle cose; il più delle volte ci troviamo di fronte ad una non corretta gestione alimentare del riproduttore già a partire dalla fase di gestazione.

Un problema analogo, anche se addirittura più accentuato, si è evidenziato con la tecnica dello svezzamento a bande di 21 giorni. In questa evenienza, pur essendo rigorosamente vietato dalla normativa sul benessere animale, capita che sovente una certa percentuale di scrofe (fino al 36% in alcuni casi) vengano svezzate sotto i 21 giorni. Ebbene in ricerche recenti si è evidenziato come questa pratica possa portare ad un ISC di 8 giorni per le pluripare e anche di 10 per le primipare, con alte % di calori differiti o ritardati ed un basso tasso di fertilità ed in altri casi ad un'elevata % di calori differiti e di ritorni fuori ciclo.

PERIODO 01/01/07 - 30/06/07		PERIODO 01/10/07 - 31/01/08
474	**totale coperture**	317
25,74	**% ritorni**	19,24%
13,29	**% vuote ad eco**	4,10%
2,74	**% vuote al parto**	0,32% #
1,05	**% eliminate coperte**	0,63%
56,75	**% parti**	74,76% #
	ISC (giorni)	
1,6%	**<=3**	4,8%
=	**4**	41,9%
39,3%	**5**	34,7%
51,6%	**6**	12,0%
4,0%	**7-8**	3,0%
1,2%	**9-11**	1,8%
1,2%	**12-20**	0,6%
1,2%	**>20**	1,2%

A questo punto mi avvio alla conclusione della mia relazione presentandovi un' ultima considerazione:
la disponibilità di chi segue tutte queste operazioni, il suo addestramento, la voglia di fare sono tutti elementi di notevole importanza, ma la capacità intrinseca dell'individuo è un'altra cosa ed è lei a far la differenza; ci sono, secondo me, allevato-

ri (o collaboratori) di serie A, B e cosi' via, per cui negli interventi che siamo chiamati a fare dobbiamo prima di tutto capire chi abbiamo di fronte, per non incorrere nel rischio di cadere nella frustrante situazione del nulla di fatto.

CARATTERISTICHE DEI PROFILI DI CIRCA UN MIGLIAIO DI ALLEVAMENTI GTTT (2004-2006)

	Profilo A 70%	Profilo B 20%	Profilo C 4%	Profilo D 6%
ISC gruppo	6,1±1,0	5,5±0,8	6,3±0,9	**8,0±1,2**
ISC primipare	7,2±1,9	6,4±1,7	7,3±1,4	**10,0±2,4**
ISC 4-6 gg %	87,4±2,2	92,4±5,5	**84,5±7,9**	**73,8±16,2**
ISC 7-22 gg %	6,9±5,1	4,6±4,2	**12,4±7,3**	**18,1±17,2**
ISC > 30 gg	1,1±1,4	0,7±0,8	0,9±0,7	3,4±1,8
Fertilità %	90,3±5,0	90,2±5,2	92,6±3,8	**86,3±5,4**
Ritorni 24-38 gg %	22,1±12,4	16,2±9,6	36,1±13,1	24,5±12,4
Allev. con. lattaz. di 21 gg %	34,2	18,6	**92,1**	**59,3**
Lattazione corta %	12,9±9,1	11,4±9,0	**19,7±9,7**	**21,5±12,2**
Nati totali	13,9±0,9	13,8±0,8	13,9±0,6	13,5±0,7
Svezzati	11,0±0,7	10,9±0,6	11,2±0,5	10,3±0,5
Nidiate modificate %	58,2±23,1	59,6±17,3	**79,5±12,3**	**42,3±22,1**

(S. Boulot e all. - IFIP e CEVA)

ABBIAMO SOLUZIONI COSÌ MIRATE
DA FARLI SENTIRE UNA SPECIE PROTETTA.
Pfizer
Pfizer Animal Health

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SIPAS

ANTIBIOTICO RESISTENZA. IMPATTO SULLA SALUTE DEL MAIALE E DELL'UOMO

Caselle di Sommacampagna (VR), 10 ottobre 2008

MECCANISMI DI ACQUISIZIONE DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA.

MECHANISMS FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE.

ANNA ZAGHINI

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria – Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.

Parole chiave: antibatterici, antibiotico resistenza, acquisizione, trasmissione, costo della resistenza.

Key words: antibacterials, antibiotic resistance, mechanisms, fitness cost.

***Riassunto*.** Gli antibatterici vengono utilizzati, sia in campo umano che in quello veterinario, da più di 60 anni ed in questi anni una elevata pressione selettiva è stata esercitata sugli ecosistemi batterici caratteristici sia dell'uomo che degli animali, portando alla comparsa della resistenza, un evento tanto "atteso" quanto "imprevedibile".
La resistenza agli antibatterici può essere *intrinseca* (naturale) oppure *acquisita*; la prima è solitamente determinata dalla mancanza del "bersaglio" cellulare attraverso cui l'antibatterico esercita la propria azione, oppure da una impermeabilità di membrana all'antibatterico stesso. La seconda invece origina da mutazioni cromosomiche, oppure dall'acquisizione di materiale genetico "trasferibile" e già presente nella popolazione batterica, indipendentemente dal fatto che questo materiale genetico sia correlato o meno alla stessa popolazione batterica che lo riceve, quindi la "scambio" può avvenire tra batteri patogeni e batteri commensali sia dell'uomo che degli animali. In ogni caso la resistenza batterica ha sempre una origine genetica.
La resistenza cromosomica si sviluppa a seguito di mutazioni nelle sequenze nucleotidiche del cromosoma batterico risultando nella sintesi di proteine o di macromolecole che differiscono da quelle originali del batterio e tali da interferire con l'attività dell'antibatterico. Come in tutte le popolazioni cellulari, le mutazioni sono degli eventi assolutamente spontanei che, solitamente, vengono "perse" o "riparate" dalla cellula stessa. Naturalmente le mutazioni che comportano l'acquisizione della resistenza si rivelano utili al batterio solo quando quest'ultimo venga a contatto con antibatterici.
Nel caso della resistenza per "trasferimento" di materiale genetico, va sottolineato come i batteri siano caratterizzati da sistemi di trasferimento di questo materiale che sono estremamente efficienti e che sono in grado di scambiare e/o di accumulare geni della resistenza. I veicoli più importanti per il trasferimento di geni della resistenza sono i plasmidi, i trasposoni e gli integroni. I principali meccanismi che i batteri utilizzano per il trasferimento della resistenza sono rappresentati da: coniugazione (plasmidi), trasduzione (batteriofagi) e trasformazione (trasferimento diretto di DNA).
Le principali "strategie" di resistenza utilizzate dai batteri sono rappresentate da: *modificazione della permeabilità*: intesa come impermeabilizzazione all'antibatterico, ma anche come capacità di espellere attivamente l'antibatterico entrato nella cellula; *modificazione dell'antibatterico*: a seguito della produzione, da parte del batterio, di enzimi in grado di modificare la molecola di farmaco inattivandola; *modificazione del*

bersaglio dell'antibatterico (ad esempio un enzima, oppure una subunità ribosomiale). Relativamente alla persistenza della resistenza agli antibatterici, va sottolineato come questo fenomeno possa essere anche molto rapido nel comparire, ma molto lento nello scomparire. Inoltre, quando un batterio sia "multiresistente", con i determinanti della resistenza geneticamente legati, la resistenza perdurerà finchè il batterio sia esposto ad antibatterici ai quali i diversi determinanti siano geneticamente legati (co-selezione).

Abstract. Antibiotics have been used for more 60 years. During this period an important selection pressure has been exerted on bacterial eco-systems in humans and animals and has led to the emergence of resistant bacteria. The development of bacterial resistance has been an expected but rather an unpredictable phenomenon.
Bacterial resistance to antibiotics may be intrinsic (natural) or acquired. Intrinsic resistance (non-susceptibility) is a characteristic of bacterial species that are homogeneously resistant to a particular antibiotic. Either because they lack the cellular mechanisms by which that particular antibiotic exerts its action or because the bacterial wall is impermeable to the antibiotic. Acquired resistance can originate from chromosomal mutation or from the acquisition of transferable genetic material already present within or unrelated bacterial populations. It can be found in every pathogenic bacterial species as well as in the commensal flora of man and animals, but the prevalence varies considerably between bacterial species and even between subspecies. All resistance has a genetic basis.
Chromosomal resistance develops from mutations in the nucleotide sequences of the bacterial chromosome resulting in the synthesis of proteins or other macromolecules that differ from the original chemical entities to interfere with the antibiotic activity. Mutations can occur continuously and irrespective of the presence of antibiotics, but are generally lost or repaired by cellular mechanisms. Mutations with increased antibiotic resistance are advantageous to the bacterium only when antibiotics are used. In general the number of the resistant mutants will decrease after cessation of exposure.
Transferable resistance can occur by means the "movement" of genetic materials. Bacteria have extremely efficient genetic transfer systems capable of exchanging and accumulating resistance genes. Certain bacterial genes, including genes encoding for resistance, can move between chromosomal and extra-chromosomal DNA elements in bacteria. The most important vehicles for transfer of resistance genes in bacteria are plasmids, transposons and integrons. The mechanisms for inter-bacterial transfer of resistance are conjugation (transmission by plasmids), transduction (transmission by bacteriophages) and transformation (direct transfer of free DNA originating, for example, from lysed bacteria).
The most common resistance mechanisms is antibiotic inactivation, but bacteria utilize four main resistance strategies. Modification of their permeability: bacteria modify their permeability either by becoming impermeable to antibiotics or by actively excreting the antibiotic accumulated in the cell. Modification of antibiotic: bacteria produce enzymes capable of modifying and directly inactivating antibiotics. Modification of target: bacteria modify the structure of the antibiotic's target molecule. Overproduction of the target.
Although antibiotics achive selection for a new type of resistance quite rapidly, removal of antibiotic stopping reverses this trend only slowly. Furthermore, in cases where a

bacterium is multiresistant with genetically linked resistance determinants, resistance will remain present as long as other antibiotics are used to which the determinant is genetically linked (co-selection).

Introduzione. Per antibiotico-resistenza si intende la capacità di un microrganismo di mantenere le funzioni vitali in presenza di un farmaco letale per il ceppo originario. La resistenza batterica è un fenomeno naturale: la popolazione batterica difende se stessa dalla minaccia dell'antibatterico con meccanismi spontanei.

Nel 1940, quando la penicillina iniziò a essere impiegata in clinica, tutti i ceppi di *S. aureus* erano sensibili, ma già nel 1947 il 66% e, nel 1951, il 75% dei ceppi isolati da pazienti del Boston City Hospital risultavano resistenti alle penicilline (Finland, 1979). Dalla scoperta della penicillina, molti antibiotici sono stati scoperti ovviando, almeno all'inizio, al problema, oggi ormai emergenza, dell'antibiotico resistenza. Gli antibatterici sono diventati indispensabili strumenti per diminuire la morbilità e la mortalità associate alle malattie infettive sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria (Johnston, 1998). L'insorgenza di resistenza e, in parte la sua diffusione, sono insite della genetica batterica quindi, di fatto, sono inevitabili una volta utilizzato un dato antibiotico. Si può affermare che la principale causa dell'aumento, su scala mondiale, della resistenza sia rappresentata dalla pressione selettiva (quanto e per quanto tempo un dato antibiotico viene utilizzato) esercitata dall'uso di antibatterici.

Levy et al. (1976) dimostrarono in polli, ai quali erano state somministrate tetracicline, la trasmissione di geni tetraciclino-resistenti tra ceppi di E. coli di un pollo, da pollo a pollo e dal pollo all'uomo. Nel 1982, la streptotricina fu introdotta come promotore di crescita nel suino. Questo antibiotico non era mai stato utilizzato in Medicina Umana e non dimostrava cross-resistenza con altri antibiotici. Un anno dopo la sua introduzione fu riscontrata la resistenza alla noursetricina in *E. coli* fecali degli stessi suini. I geni della resistenza erano localizzati sul trasposone Tn-1825 e, dopo due anni, lo stesso trasposone fu riscontrato non solo nei batteri isolati dalle feci degli allevatori e dei loro familiari, ma anche negli abitanti delle case vicine, come pure in E. coli isolati da infezioni del tratto urinario in persone che non avevano avuto contatti con la fattoria, ma che vivevano nelle vicinanze. Successivamente i medesimi geni furono ritrovati anche in batteri patogeni; non solo nei batteri zoonotici, come *Salmonella spp*., ma anche *Shigella spp*., un batterio che colpisce solo l'uomo e non gli animali (Hummel *et al.*,1986).

Meccanismi di base della resistenza. Va distinta la <u>resistenza intrinseca</u> da quella <u>acquisita</u>.

I batteri possono essere naturalmente resistenti ad alcuni antibiotici, ad esempio a causa dell'impossibilità di raggiungere il sito di azione (assenza delle strutture bersaglio o impermeabilità) o di agire (presenza di enzimi inattivanti). Per questo tipo si resistenza si configura solo un TRASFERIMENTO VERTICALE.

Diversamente, nell'antibiotico resistenza acquisita i batteri inizialmente sensibili subiscono una modificazione ereditaria (mutazione cromosomica), oppure "acquisiscono" materiale genetico contenente l'"informazione resistenza" (trasferimento genico) che riduce la loro sensibilità o li rende insensibili ad un dato farmaco. Per la resistenza acquisita si parla invece di un TRASFERIMENTO ORIZZONTALE.

<u>Mutazione cromosomica.</u> Il DNA della cellula sensibile può subire una mutazio-

ne in seguito alla quale una proteina che viene normalmente prodotta dalla cellula viene alterata nella sua capacità di interagire con il farmaco o di svolgere la funzione necessaria al suo effetto. Questa mutazione è un processo naturale e spontaneo che la cellula batterica subisce indipendentemente dal farmaco ma che, in seguito ad un eventuale "contatto", consente di sopravvivere e di dare vita ad una popolazione farmaco resistente completamente nuova. L'unico ruolo svolto dall'antimicrobico è quello di fornire una forte pressione di selezione a favore delle cellule mutate-resistenti ed impedire invece la crescita delle cellule sensibili. Quindi la maggior parte della popolazione iniziale non diviene resistente, ma risponde al farmaco nel modo atteso, per poi essere sostituita dalle cellule meno sensibili (resistenti) al farmaco (Bryson e Demerc, 1955).
Nello sviluppo delle mutazioni che riguardano la resistenza di tipo cromosomico, si osservano due modelli distinti: il *modello one-step*, in cui la concentrazione minima inibente (MIC) può aumentare notevolmente con una singola mutazione (tipico della streptomicina, una sola mutazione fa variare la sensibilità di 1000 volte) ed il *modello multi-step*, in cui l'evento risulta essere più graduale, tipico invece della penicillina. In quest'ultimo è necessario che la cellula batterica, per sviluppare resistenza, sia esposta ripetutamente a concentrazioni crescenti del farmaco poichè il meccanismo richiede una serie di mutazioni conseguenti.

Trasferimento genico (extra-cromosomica). Sebbene i batteri possano sviluppare resistenza attraverso il processo di mutazione e selezione, nella maggior parte dei casi la farmaco resistenza incontrata in clinica tra i batteri patogeni è dovuta al trasferimento dei geni per la resistenza da un ceppo batterico ad un altro. Inoltre, frequentemente, numerosi geni vengono trasferiti contemporaneamente alla popolazione sensibile al farmaco, determinando resistenza a parecchi antibiotici con meccanismi di azione completamente diversi (multi resistenza). Quindi il trattamento con uno qualsiasi di questi farmaci seleziona ceppi resistenti non solo a quel farmaco, ma ad altri farmaci a cui la popolazione batterica non è mai stata esposta. Questo metodo di acquisizione della farmaco resistenza è nota come "farmacoresistenza multipla infettiva e trasmissibile" (Falcow, 1975). Quest'ultima non può essere giustificata sulla base del meccanismo di mutazione e selezione, perché la probabilità che un singolo ceppo subisca una mutazione tale da renderlo resistente a tutti e tre gli antibatterici è estremamente bassa.
I geni per la farmaco resistenza trasmissibile sono localizzati su pezzetti circolari di DNA extracromosomico denominati "plasmidi". Infatti i batteri hanno una notevole capacità di condividere informazioni che permettono loro di sopravvivere in condizioni ambientali avverse: l'assenza di una membrana nucleare consente ai geni di muoversi facilmente dai cromosomi verso gli altri elementi genetici e da questi verso altri batteri.
PLASMIDI. I plasmidi sono elementi liberi e circolari di DNA (da 1 a 500 geni; da 2 kpb a > 100 kpb) extra cromosomico dotati di capacità replicativa, sono fondamentali nell' evoluzione dei batteri in quanto influiscono sulla replicazione, sul metabolismo, sulla fertilità come pure sulla resistenza alle tossine batteriche, agli antibiotici ed ai batteriofagi; assicurano quindi, una maggiore probabilità di sopravvivenza e di propagazione. I plasmidi possono *in toto* o in parte integrarsi con altri plasmidi o con il

DNA cromosomiale.
I plasmidi per la farmaco resistenza sono stati classificati in plasmidi R, quando sono auto-trasmissibili per la coniugazione (plasmidi coniugativi), e in plasmidi *r* quando non sono auto-trasmissibili (plasmide non coniugativo). Questi ultimi sono più piccoli proprio perché non contengono i geni per il trasferimento coniugativo; si trovano in molti batteri, ma sono particolarmente importanti per gli stafilococchi e per i Gram+, per i quali sono responsabili della maggioranza o di tutte le farmaco resistenze mediate da plasmidi. Di solito, i plasmidi r codificano la resistenza ad un singolo antibiotico e, solo raramente, la resistenza a due antibiotici. Campioni clinici di stafilococchi possono risultare resistenti a più antibiotici perché contengono parecchi plasmidi r, ciascuno dei quali esiste nella cellula in molte copie (Pratt e Taylor, 1998).
TRASPOSONI. Per diversi anni, non è stato chiaro come specifici geni per la farmaco resistenza si possano essere diffusi così rapidamente. Sebbene plasmidi e batteriofagi siano validi vettori per il trasferimento della resistenza, la sola loro esistenza non poteva spiegare perché generi diversi potessero aver acquisito praticamente lo stesso gene per la resistenza ad uno specifico farmaco. Tutto questo fu spiegato con l'esistenza di elementi genetici trasponibili: i trasposoni (hanno dimensioni variabili: da 1kpb a 60 kpb). Essi sono elementi mobili di DNA che hanno la capacità di integrarsi in numerose sequenze di DNA non omologhe, di "saltare" da un plasmide ad un altro, da un plasmide ad un cromosoma batterico e viceversa, con un meccanismo che non richiede le funzioni di ricombinazione del batterio (Kleckner, 1981). Si possono quindi ritrovare trasposoni identici nel genoma, o nei plasmidi, di organismi diversi.
La capacità di trasporre geni della farmaco resistenza da un sito all'altro dipende, in parte, dalla presenza di sequenze di inserzione IS. La più semplice forma di trasposone contiene una sequenza di inserzione IS contenente solo i geni deputati alla trasposizione; la forma più complessa invece presenta una regione centrale, con geni "passeggeri" che codificano per informazioni diverse dalla trasposizione (ad esempio per l' antibiotico resistenza), affiancata in entrambi i lati da sequenze di inserzione (Saylers e Amiable-Cuevas, 1997). Il DNA plasmidico può essere introdotto nel cromosoma batterico dove il plasmide non può replicarsi ma, se il plasmide contiene un trasposone per la farmaco resistenza, i geni della farmaco resistenza possono essere liberati per mezzo della trasposizione nel cromosoma batterico o in un plasmide residente. Il DNA trasposto può replicarsi anche se il plasmide donatore della farmaco resistenza è andato perduto. Quindi la trasposizione permette la diffusione dei geni per la farmaco resistenza ad una varietà di batteri ancora più ampia di quanto, da soli, possano fare i vettori plasmidici.
INTEGRONI (cassette di resistenza). Sono piccoli elementi genetici mobili (1 solo gene, < 2 kpb) privi di sistemi di replicazione e di trasposizione; il gene di cui sono costituiti è solitamente un gene di resistenza. Gli integroni sono spesso presenti nei plasmidi, con una specifica struttura costituita da due regioni fisse ed una regione centrale in cui possono essere contenuti i "gene cassettes" per l'antibiotico resistenza. I gene cassettes sono elementi che contengono un singolo gene ed un sito ricombinante. Molteplici "gene cassettes" possono essere disposti in tandem, e più di 60 diversi cassettes sono stati identificati fino ad oggi per la resistenza a aminoglicosidi, betalattamici, cloramfenicolo, streptomicina e trimetroprim (Hall, 1999).

Trasferimento della resistenza. Esistono tre meccanismi con cui i geni della resistenza possono essere trasferiti da un batterio ad un altro: TRASFORMAZIONE, TRASDUZIONE e CONIUGAZIONE.

TRASFORMAZIONE. Piccole porzioni di DNA contenenti i geni della farmaco resistenza vengono captati dall'ambiente da un batterio ancora sensibile per essere incorporati nel cromosoma di quest'ultimo. Infatti la morte di una cellula non comporta necessariamente la distruzione del materiale genetico: quando i batteri si lisano spesso rilasciano il loro DNA nel mezzo circostante. Questo DNA mantiene la sua capacità di dirigere la sintesi di proteine specifiche nel caso penetri in un'altra cellula vivente. Questa cellula ricevente adsorbe sulla sua superficie, le porzioni di DNA rilasciato, che viene poi trasportato attraverso la membrana cellulare nel citoplasma, quindi incorporato mediante ricombinazione nel suo cromosoma. Di conseguenza questa cellula ricevente acquisirà nuovi caratteri, tra cui anche la resistenza. La trasformazione può rappresentare un importante meccanismo naturale di trasferimento di materiale genetico tra i batteri; in animali infetti alcuni ceppi batterici possono trasformare i microrganismi della flora normale in patogeni pericolosi (Poli e Cocilovo, 1996). Solitamente la trasformazione avviene tra batteri strettamente correlati quindi caratterizzati da una stretta omologia tra le sequenze nucleotidiche. La trasformazione è un fenomeno di frequente riscontro in natura, tuttavia ha una scarsa rilevanza clinica (Pratt e Taylor, 1998).

TRASDUZIONE. Questo tipo di trasferimento, quando trasmette la resistenza, ha una notevole importanza clinica, specialmente per i batteri Gram+. La maggior parte degli stafilococchi resistenti alla penicillina, per esempio, ha acquisito i geni per le beta-lattamasi attraverso questo meccanismo (Lacey, 1975).

In questo caso il trasferimento genetico è mediato dai *batteriofagi*. Un batteriofago è un virus capace di infettare e lisare determinati batteri: dopo la penetrazione nel batterio, il fago sfrutta l'apparato biosintetico della cellula ospite per replicarsi a seguito della lisi della cellula stessa, la progenie viene quindi liberata (ciclo litico). Più precisamente, quando un fago infetta un batterio, il cromosoma della cellula ospite si frammenta, durante la replicazione del fago, uno di questi frammenti può essere accidentalmente impacchettato col DNA fagico nel capside di un virione. Se questo, dopo essere stato rilasciato, infetta un'altra cellula microbica, vi trasferisce anche i geni prelevati dal batterio infettato in precedenza; poiché il fago può includere, quindi, trasferire, qualunque regione del cromosoma batterico, si parla di trasduzione generalizzata; generalmente sono coinvolti batteri della stessa specie (Poli e Cocilovo, 1996).

CONIUGAZIONE. Mediante questo meccanismo i geni per la farmaco resistenza contenuti in un plasmide vengono passati da una cellula all'altra attraverso una connessione diretta tra le due cellule formata da un pilo sessuale (*sex pilus*), la cui produzione è codificata da plasmidi di coniugazione. Il donatore conserva una copia del plasmide, il ricevente può così diventare a sua volta un potenziale donatore.

La coniugazione può avvenire tra varietà di batteri della stessa specie, tra specie dello stesso genere, o anche tra specie appartenenti a diverse famiglie (popolazioni batteriche miste: cutanea, respiratoria, digerente, genitale). Ad esempio, *Staphilococcus aureus* può scambiare materiale genetico con *Enterococcus faecalis* o *Escerichia coli* (Prescott *et al.,* 2002). Questo trasferimento avviene principalmente tra i Gram- ed è il principale meccanismo con cui viene trasmessa la resistenza tra gli enterobatteri come *Shigella*

ed *E. coli* (Pratt e Taylor, 1998). Anche tra i Gram+ è stata osservata la possibilità di passaggio di materiale genetico simile alla coniugazione, ma solo in seguito ad un contatto fisico diretto tra le cellule, senza l'intervento dei pili (Poli e Cocilovo, 1996).

Meccanismi biochimici della resistenza. Come conseguenza delle "modificazioni" genetiche precedentemente descritte, nel tempo, i batteri hanno sviluppato numerosi e spesso "eleganti" *strategie di resistenza.*

ALTERAZIONE DELLA STRUTTURA CHIMICA DELL'ANTIBATTERICO. Poiché molti antibiotici sono prodotti da microrganismi del terreno, non sorprende che i batteri che vivono nell'ambiente di questi microrganismi sappiano produrre enzimi che inattivano gli antibiotici (Rather *et al.,* 1993). Possono venire inattivati per degradazione enzimatica (ad esempio le penicilline) o attraverso una modificazione biochimica tale da impedire loro l'interazione con il sito bersaglio (aminoglicosidi). La modificazione enzimatica indotta di solito conferisce un alto livello di resistenza: l'espressione dell'enzima TEM-1 β-lattamasi prodotto da *E. coli*, ad esempio, incrementa la concentrazione minima inibente (MIC) dell'ampicillina da 8 a > 10,000 μg/ml. L'*Enterococcus faecalis* produce un enzima che gli permette di resistere all'attività degli aminoglicosidi tra cui la gentamicina per la quale la MIC aumenta da 32-64 a >2.000 μg/ml (Rice *et al.*, 2003).

POMPE AD EFFLUSSO. Questo meccanismo sviluppato dai batteri consiste in una pompa che rimuove una o più classi di antibiotici dall'interno della cellula, non permettendo ai farmaci di raggiungere adeguati livelli per svolgere la loro azione. Possono esserci pompe più o meno selettive. La maggior parte di esse sono localizzate nella membrana citoplasmatica ed utilizzano la forza motrice dei protoni per trasportare all'esterno gli antibiotici.

L'antibiotico passa la parete esterna della cellula tramite i pori formati dalla porina, per poi diffondere attraverso lo spazio periplasmatico fino alla membrana interna, che attraversa per mezzo della captazione attiva, probabilmente mediata da carrier, pilotato da un gradiente elettrochimico. Nella membrana interna, esiste inoltre un sistema di efflusso attivo ma più debole. Il livello intracellulare del farmaco dipende dalla velocità di entrata del farmaco attraverso la parete esterna e le successive velocità di captazione ed efflusso della membrana interna. Nei batteri sensibili al farmaco, la velocità di efflusso è relativamente lenta e nella cellula si accumulano rapidamente livelli citotossici del farmaco. Nei batteri resistenti, i sistemi di captazione e di efflusso operano normalmente ma, per mantenere bassi i livelli intracellulari del farmaco un sistema di efflusso ad alta affinità trasporta velocemente l'antibiotico fuori dalla cellula (Mc Murry *et al.,* 1980). Questo meccanismo è tipicamente sviluppato dai batteri nei confronti delle tetracicline: la proteina TET, codificata da un plasmide, lega la tetraciclina e la trasporta rapidamente verso l'esterno attraverso la membrana citoplasmatica dal citoplasma allo spazio periplasmatico.

MODIFICA DEL TARGET. Poiché l'interazione dell'antibiotico con il suo sito di azione è generalmente molto specifica, anche piccole modifiche di questo possono avere importanti effetti sulla efficacia del farmaco. Esistono numerosi esempi di resistenza acquisita tramite l'alterazione del target, come quella ai fluorochinoloni tramite la modifica della DNA-girasi, o alle tetracicline con meccanismi di protezione del sito ribosomiale. Il grado di resistenza acquisito tramite questo meccanismo è variabile e può dipendere dalla capacità della struttura mutata di perdere completa-

mente o mantenere almeno in parte le sue normali funzioni (Rice *et al.* 2003).
LIMITATO ACCESSO AL SITO DI AZIONE. Se il farmaco deve superare delle barriere prima di raggiungere il suo sito di azione, cambiamenti a carico di queste barriere possono essere un altro importante meccanismo di antibiotico resistenza. Tutti i batteri Gram- sono dotati di un involucro esterno che deve essere attraversato dal farmaco prima di raggiungere la membrana citoplasmatica. Per i farmaci idrofili questo passaggio avviene attraverso pori formati da proteine denominate porine; se queste subiscono modificazioni secondarie a mutazioni, la diffusione dell'antimicrobico può essere notevolmente diminuita. Questa resistenza avviene ad esempio per le cefalosporine (Rice *et al.,* 2003). Una riduzione della velocità di diffusione facilitata o di trasporto attivo è frequentemente responsabile della resistenza ai sulfamidici.
Costo biologico della resistenza (fitness cost). I batteri traggono vantaggio dall'acquisizione di geni della resistenza ad un antibatterico, quando questo è presente. Tuttavia è lecita la domanda: quando l'antibatterico è assente, i batteri risentono di un "costo" della resistenza? Se così fosse, l'unica strategia per controllare la diffusione della resistenza potrebbe essere quella di sospendere l'uso di un particolare antibatterico fino a quando i "genotipi resistenti" diminuiscono ad una bassa frequenza. Numerosi studi dimostrano infatti che, in assenza di antimicrobici, i genotipi resistenti sono caratterizzati da un minore "benessere" rispetto agli analoghi sensibili, indicando in questo modo un "costo" legato alla resistenza.
Per arrivare a sviluppare la resistenza infatti, i batteri subiscono dei cambiamenti e sono costretti a modificare in parte la loro normale fisiologia. Ma non è sempre detto che questa nuova condizione non abbia anche effetti negativi. Ad esempio per sviluppare una resistenza di tipo plasmidico devono inevitabilmente sintetizzare ulteriori aminoacidi e proteine, questo processo richiede un elevato dispendio di energia ed i nuovi prodotti sintetizzati potrebbero interferire con la fisiologia del microrganismo.
Viceversa, Blot *et al.* (1991) osservano che il gene Tn5 codificante la resistenza alla bleomicina aumenta la sopravvivenza di *E. coli* in condizioni di prolungata carenza di nutrimento, sebbene non fosse presente alcun antibatterico. Bleomicina agisce danneggiando il DNA, lo stesso danno si manifesta nelle carenze di fattori nutritizi; gli Autori ritengono quindi che il gene codificante la resistenza alla bleomicina svolga una attività di "riparazione" del DNA.
Acquisire la resistenza ha quindi un "costo"per il batterio e questa variabile potrebbe influire sulla stabilità, quindi sulla eventuale reversibilità della resistenza (Levin, 2002). Ad esempio, le mutazioni nel gene rpoB in *E. coli*, nel gene fusA in *S. tiphimurium* e in *S. aureus*, come pure nel gene in rpsL in *E. coli* diminuiscono la velocità di trascrizione, di conseguenza il tasso di crescita si riduce (Andersson, 2003). Da vari studi, tra cui quello di Johnson e Russo (2002) relativo ad *E. coli*, è emerso come la multi resistenza sia strettamente legata ad una ridotta virulenza. Tuttavia, la stretta relazione tra la resistenza ed i markers della virulenza, indipendente da effetti collegati al gruppo filogenetico, è stata osservata tra isolati MDR resistenti solo alla gentamicina.
Questo indicherebbe come i geni codificanti per la resistenza e quelli per i fattori di virulenza sono presenti sullo stesso plasmide, oppure come i fattori di virulenza vengono persi in occasione delle mutazioni che determinano la resistenza (Johnson e Russo, 2002).

Quindi, se la resistenza riduce il fitness, i ceppi resistenti potrebbero perdere una competizione nei confronti di quelli sensibili, in un contesto in cui manca la pressione degli antibiotici come, ad esempio, quando termina la terapia antibatterica. La quantità di tempo necessaria, per ridurre ad un livello basso un elevato numero di batteri resistenti, è inversamente proporzionale al costo della resistenza.
Alcuni studi dimostrano comunque, che la mutazione che conferisce resistenza può anche essere gratuita o determinare scarse conseguenze negative al batterio, come una riduzione nei livelli di crescita di un solo 1%. Esempi in questo senso sono i seguenti: mutazioni rpsL (resistenza alla streptomicina) in *M. tuberculosis, E. coli* e *S. typhimurium*; mutazioni katG (resistenza ad isoniazide) in *M. tuberculosis*; mutazioni gyrA e parC (resistenza ai fluorochinoloni) in *S. pneumoniae* (Sander *et al,* 2002; Andersson, 2003).
Il batterio comunque risponde all'alto costo con mutazioni compensatorie che non influiscono sulla capacità di resistere all'antimicrobico, ma permettono al batterio di divenire più stabile; queste mutazioni compensatorie sono state osservate *in vitro, in vivo* ed in situazioni cliniche. Ad esempio, mutanti rpsL in *S. typhimurium* resistenti alla streptomicina possono essere "compensati" da mutazioni nelle proteine ribosomiali S4, S5 e L19. Mutanti fusA in *S. typhimurium e S. aureus* acido fusidico resistenti, rpoB rifampicina resistenti in E. coli, possono essere compensati da numerose mutazioni intrageniche (Andersson, 2003). Björkman et al. (1998) hanno esteso queste evidenze anche a sistemi in vivo. Essi hanno infatti dimostrato che mutanti di *S. typhimurium* resistenti a streptomicina, rifampicina ed acido nalidixico erano di fatto privi di virulenza nel topo, indicativo di un elevato costo per la resistenza. Tuttavia, analogamente a quanto avviene *in vitro*, i batteri sviluppano meccanismi di compensazione che ristabiliscono la virulenza pur mantenendo la resistenza agli antibatterici.
In questo modo le speranze che il batterio perda la capacità di resistere si abbassano notevolmente. Generalmente infatti, i meccanismi di compensazione sono più frequenti rispetto a quelli di reversione. Una volta compiute queste "mutazioni secondarie compensatorie", anche in assenza dell'antibiotico i ceppi resistenti hanno inevitabilmente il sopravvento sui ceppi sensibili (Schrag *et al.,* 1997).

Riferimenti bibliografici

1) Andersson D.I. (2003) Persistance of antibiotic resistent bacteria, Current Opinion in Microbiol., 6, 452-456.
2) Bennet P.M. (1995) The spread of antibiotic resistance. In: Baumberg S, Young J.P.W., Wellington E.M.H., Sunders J.R. (Eds), Population Genetics in bacteria. University Press, Cambridge, 317-344.
3) Björkman J., Hughes D., Andersson D.I. (1998) Virulence of antibiotic resistant Salmonella typhimurium, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 3949-3953.
4) Blot. M., Meyer J., Arber W. (1991) Bleomycin-resistance gene derived from trasposon Tn5 confers advantage to Escherichia Coli K-12, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 9112-9116.
5) Bryson V., Demerc M. (1955) Bacterial resistance, Am. J. Med., 18, 723-725.
6) Falcow S. (1975) Infectious Multiple Drug Resistance Pion Ltd, London.
7) Finland M. (1979) Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975, Rev. Infect. Dis., 1, 4-22.

8) Hall R.M. (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann. NY Academy Sci., 870, 68-71.
9) Hummel R., Tschape H., Witte W. (1986) Spread of plasmide mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry, J. Basic Microbiol., 26, 461-466.
10) Johnston A.M. (1998) Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. Br. Med. J., 46, 14-20.
11) Johnson J.R., Russo T.A. (2002) Extraintestinal pathogenic Escherichia Coli: "The other bad Escherichia Coli", J. Lab. Clin. Med., 139, 155-62.
12) Kleckner N. (1981) Transposable elements in prokariotes, Ann. Rev. Genet., 15, 341-347.
13) Lacey R.W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of Staphilococcus Aureus and their clinical importance, Bacteriol. Rev., 39, 1-10.
14) Levin B.R. (2002) Models for the spread of resistance pathogens.,Net. J. Med., 60, 58-64.
15) Levy S.B., Fitzgerald G.B., Macone A.B. (1976) Spread of antibiotic resistance plasmids from chicken to chicken and from chicken to man, Nature, 260 (5546), 40-42.
16) Mc Murry L., Petrucci R.E., Levy S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia Coli, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77, 3974-3377.
17) Poli G., Cocilovo A. (1996) Microbiologia e immunologia veterinaria UTET (Ed.), 130-137.
18) Pratt W.B., Taylor P. (1998) Farmacoresistenza In: Farmacologia. Meccanismi d'azione dei farmaci, Ed. Zanichelli, Bologna.
19) Prescott J.F., Hanna W.J.B., Reid-Smith R. (2002) Antimicrobial drug resistance in dogs, Can. Vet. J., 43, 107-116.
20) Rather P.N., Orosz E., Shaw K.J., Hare R., Miller G. (1993) Characterization and trscriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from Providencia stuartii, J Bacteriol., 175, 6492-6498.
21) Rice L.B., Sahm D., Bonomo R.A. (2003) Mechanisms of Resistance to Antimicrobial agents, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Yolkien R.H., Manual of Clinical Microbiology.
22) Sander P., Springer B., Prammananan T., Sturmfels A., Kappler M., Pletschet M., Bottger E.C. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. Antimicrob. Ag. Chemother., 46, 1204-1211.
23) Saylers A.A., Amiable-Cuevas C.F. (1997) Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?, Antimicrob. Ag. of Chemother., 42, 2321-2328.
24) Schrag S.J., Perrot V., Levin B.R. (1997) Adaptation to the fitness cost of antibiotic resistance in Escherichia Coli, Proc. Royal Soc. Lond. B, 264, 1287-1291.

IL MONITORAGGIO DEI BATTERI ANTIBIOTICO-RESISTENTI DI ORIGINE SUINA E IMPATTO SULLA SALUTE PUBBLICA

ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING ON BACTERIA OF SWINE ORIGIN AND ITS IMPACT ON PUBLIC HEALTH

ANTONIO BATTISTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma
Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza
National Reference Laboratory on Antimicrobial Resistance

Parole chiave: Antibioticoresistenza, suini, zoonosi, monitoraggio, sorveglianza, salute pubblica
Key Words: Antimicrobial resistance, pigs, zoonosis, monitoring, surveillance, Public Health

Riassunto. L'allevamento suino è considerato una delle fonti principali di diffusione di agenti zoonosici trasmissibili all'uomo con gli alimenti lungo le filiere produttive. Il fenomeno dell'antibioticoresistenza è considerato attualmente una priorità in sanità pubblica da organismi internazionali (WHO, OIE, FAO) e agenzie di Sanità Pubblica Internazionali e Comunitarie. La Commissione Europea richiede che gli Stati Membri si dotino di un sistema di monitoraggio e sorveglianza dell'antibioticoresistenza, come "zoonosi trasversale" che complica il quadro della trasmissione lungo le filiere produttive degli agenti zoonosici trasmissibili con gli alimenti (Dir. 99/2003/EC, recepita con D. Lgs 1991/96, obbligatorio per *Salmonella* e *Campylobacter,* fortemente raccomandato per microrganismi indicatori). In Italia, Il Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, coadiuvato dalla rete degli IIZZSS e dall'Istituto Superiore di Sanità, è impegnato nel monitoraggio dell'antibioticoresistenza secondo metodologie armonizzate a livello europeo a livello di popolazione e di laboratorio. Nel settore dell'allevamento suino, in ragione della pressione selettiva esercitata con numerose classi di molecole antibiotiche, permangono problemi di multiresistenze in Salmonella associate al suino (es. ser. Typhimurim, Derby) e in Campylobacter coli resistenti a fluorochinolonici e macrolidi. L'emergenza di un clone di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è stata recentemente sottoposta a monitoraggio per scopi di risk assessment e per valutarne l'impatto in sanità pubblica.

Abstract. Pig farming is considered one of the most relevant source of fooodborne pathogens to humans, and a relevant source af antimicobial resistance along the food chain. The European Commission (Dir. 99/2003/EC), scientifically supported by the EFSA requested to Member States a mandatory surveillance system on zoonotic pathogens and related antimicrobial resistance (Salmonella and Campylobacter) and strongly recommended surveillance on indicator bacteria (*Escherichia coli, Enterococci*) in primary productions. In Italy, antimicrobial resistance monitoring of food-borne major pathogens like *Salmonella* and *Campylobacter*, along with

indicator bacteria, is co-ordinated by the National Reference Laboratory on Antimicorobial Resistance (IZSLT Rome) in collaboration with the IIZZSS network and the National Institute of Health, through population based methods and laboratory methods harmonised at European level. Multiresistant host- associated Salmonella (e. g. ser. Typhimurim, Derby) and *Campylobacter* coli resistant to fluoroquinolones and macrolides are major concerns in pig farming and along the food chain in Italy. An emerging clone of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) seems to be widespread in Italian slaughter pigs and it is currently monitored for risk assessment purposes.

INTRODUZIONE

Gli antibiotici sono utilizzati negli animali zootecnici allevati nei paesi industrializzati da circa 50 anni. Accanto a vantaggi per la produttività e per il benessere animale, l'emergenza e la diffusione della resistenza agli antimicrobici è divenuta una priorità a livello internazionale e Comunitario. Il fenomeno dell'antibioticoresistenza è considerato attualmente una priorità in sanità pubblica da organismi internazionali (WHO, OIE, FAO) e agenzie di Sanità Pubblica Internazionali e Comunitarie. L'allevamento suino è considerato una delle fonti principali di diffusione di agenti zoonosici trasmissibili all'uomo con gli alimenti lungo le filiere produttive. La Commissione Europea richiede che gli Stati Membri si dotino di un sistema di monitoraggio e sorveglianza dell'antibioticoresistenza, come "zoonosi trasversale" che complica il quadro della trasmissione lungo le filiere produttive degli agenti zoonosici trasmissibili con gli alimenti (Dir. 99/2003/EC, recepita con D. Lgs 1991/96, obbligatorio per *Salmonella e Campylobacter*, fortemente raccomandato per microrganismi indicatori). In Italia, Il Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, coadiuvato dalla rete degli IIZZSS e dall'Istituto Superiore di Sanità, è impegnato nel monitoraggio dell'antibioticoresistenza secondo metodologie armonizzate a livello europeo a livello di popolazione e di laboratorio.
La recente emergenza di cloni MRSA in suini allevati in alcuni paesi del Centro Europa e del Nord America ha destato preoccupazione soprattutto in seguito all'evidenza di trasmissione a categorie professionali associate all'allevamento suino (1, 2). In Italia, sono in corso indagini nella popolazione suina adeguate all'acquisizione di informazioni su presenza e diffusione di tale agente alivello di popolazione di riproduttori e di progenie da macello (3).

MATERIALI E METODI

Al fine di acquisire informazioni accurate e rappresentative circa la situazione italiana ed adempiere ai debiti informativi nazionali e comunitari (Report Comunitario EFSA secondo Dir. 99/2003/EC e DLvo 191/2006), il CRN per l'antibioticoresistenza riceve isolati di Salmonella spp. e Campylobacter jejuni e C. per la produzione di dati quantitativi di sensibilità (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ad un panel di consenso comunitario di molecole antibiotiche.
La selezione degli isolati è effettuata sarà effettuata secondo quanto segue:

Popolazione oggetto di studio:
Isolati di Salmonella e Campylobacter da piani comunitari (Reg 2160/2003 e relative Decisioni) e da sorveglianza passiva della rete degli IIZZSS.
a. Isolati da Piani Comunitari
La Decisione Comunitaria 2007/407/EC prevede che gli Stati Membri riportino informazioni di sensibilità agli antibiotici nelle seguenti specie e linee produttive: galline ovaiole, tacchini da carne, boiler, suini all'ingrasso, provenienti da piani di monitoraggio e piani di controllo (Reg. 2160/2003). Per ogni linea produttiva, si chiede agli Stati Membri di riportare dati per un numero di isolati pari a 170, un isolato per allevamento (per i suini) ed un isolato per gruppo (nelle specie aviarie). Prevede inoltre che si integrino, qualora necessario, i dati provenienti dai baseline studies comunitari e dai piani di controllo nelle produzioni primarie con quelli della sorveglianza passiva di laboratorio (p. es. dati di monitoraggio volontari a carattere regionale o nazionale, attività diagnostiche nelle produzioni primarie, controllo ufficiale degli alimenti). Gli isolati dei piani di monitoraggio e controllo (es. baseline survey in suini al macello) sono conservati dai rispettivi IIZZSS ed inviati al CRN per la produzione di dati secondo le indicazioni comunitarie. Gli isolati inclusi nel monitoraggio rispondono al seguente requisito: viene selezionato non più di un isolato per unità epidemiologica (allevamento nel caso dei suini). La reportistica alla Comunità Europea segue le specifiche tecniche riportate nella citata Dec. Comm. 407/2007/EC e riporta dati quantitativi di distribuzione di MICs e dati qualitativi (% di resistenze alle singole molecole, frequenze di multiresistenze) per specie zootecnica e per attività.

RISULTATI

Si riportano a titolo di esempio nelle Figure seguenti, i dati di monitoraggio delle resistenze nella filiera suina (produzioni primarie e carni suine) per Salmonella.

Figura 1: Salmonella spp.. Resistenze (tutti i sierotipi più prevalenti) in suini al macello, Italia (Dec. Comm. 668/2006/EC), 2007

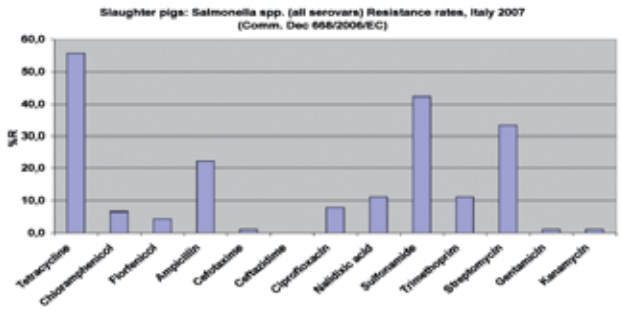


Figura 2: Salmonella spp.. Resistenze dei sierotipi più prevalenti in suini al macello, Italia (Dec. Comm. 668/2006/EC), 2007

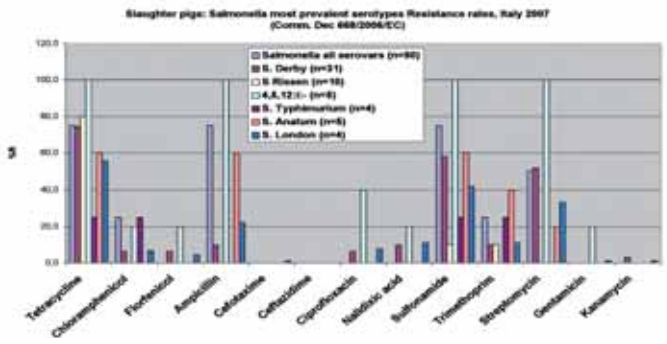


Figura 3: Salmonella spp.. Multiresistenze in suini al macello, Italia (Dec. Comm. 668/2006/EC), 2007

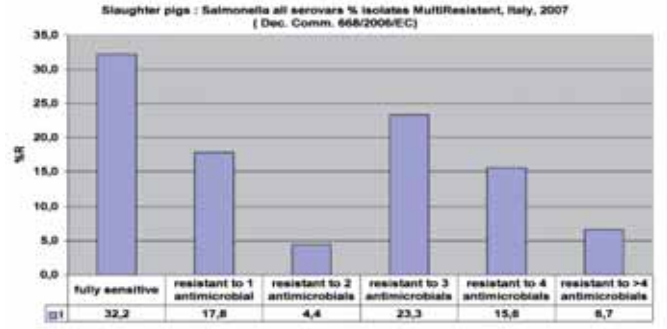


Figura 4: Salmonella spp.: Multiresistenze per sierotipo in suini al macello, Italia (Dec. Comm. 668/2006/EC), 2007

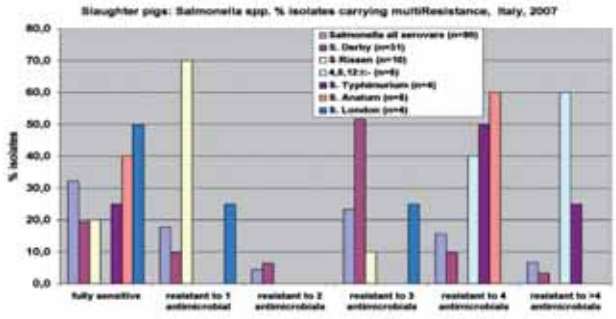
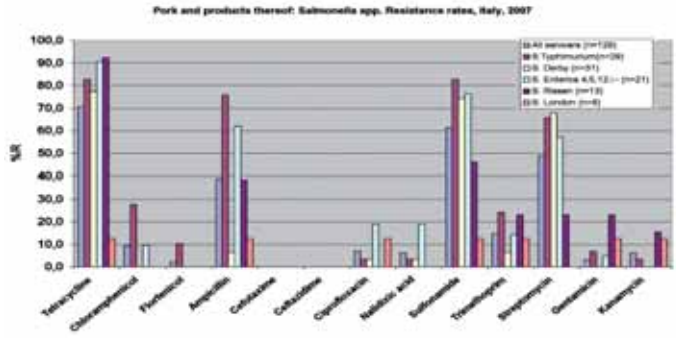


Figura 5: Salmonella spp. Resistenze in carni e derivati suini, Italia, 2007



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'allevamento suino è considerato una delle principali fonti di esposizione umane da "food-borne pathogens", nella Comunità Europea specialmente per *Salmonella* spp e *C. coli*, considerato secondo in termini di priorità soltanto alle filiere avicole. Studi epidemiologici, tra cui studi di attribuzione, e di epidemiologia molecolare confermano tale ruolo, da cui la volontà della Commissione Europea di avviare baseline surveys prioritariamente in queste filiere produttive, allo scopo di trarre informazioni accurate e rappresentative per impostare possibili strategie di controllo e riduzione della prevalenza nelle produzioni primarie (4). La pressione selettiva esercitata nell'allevamento suino attraverso l'uso estensivo negli ultimi decenni di molecole di varie classi di antimicrobici a scopo terapeutico, di "profilassi" e "metafilassi", oltre che di promotori di crescita, ha favorito il vantaggio selettivo di cloni resistenti a varie classi di molecole "chiave" (p. es. fluorochinolonici, beta-lattamici, macrolidi oltre che di molecole "storiche" come sulfonamidi, tetracicline, aminoglicosidi di I generazione) in terapia umana e animale (Critically Important Antimicrobials e Veterinary Critical Important Antimicrobials), di cloni multiresistenti, e la diffusione di determinanti genetici di resistenze in grado di trasmettersi orizzontalmente tra specie batteriche commensali e zoonosiche nelle filiere zootecniche. Le survey nelle produzioni primarie confermano che i cloni dei sierotipi delle produzioni primarie si ritrovano nelle carni suine commercializzate e trasformate, trasferendosi lungo la filera alimentare insieme aid eterminanti di resistenza a gli antibiotici. Esempi di tali problematiche sono costituiti da alcuni sierotipi di Salmonella a diffusione clonale (es. S. Typhimurium multiresistenti come DT 104 e simili, e S. enterica 4,5,12:i:-) e sierotipi associati all'ospite come S. Derby.

In Italia risulta attuale anche la problematica delle elevate frequenze di resistenza a fluorochinolonici e macrolidi di C. coli di origine suina, anch'essa derivante dall'uso sistematico a scopo terapeutico reale e "mascherato"di tali classi di antibiotici nelle produzioni primarie.

Inoltre, vi sono attualmente evidenze sulla diffusione di cloni di S. aureus meticillino-resistenti (MRSA) nella popolazione suina italiana, analogamente a quanto già di mostrato in altri paesi industrializzati comunitari e terzi. Tali cloni costituisco un pericolo che

si traduce in rischio di colonizzazione ed infezione, specialmente per contatto diretto, e specialmente in categorie professionalmente esposte.
La mancanza di un sistema di monitoraggio informatizzato "*ab origine*" sul consumo degli antimicrobici nelle produzioni primarie suine come in altre filiere produttive (ovvero che disponga di dati informatizzati "nativi" di natura qualitativa e quantitativa almeno sulle prescrizioni) costituisce un ulteriore ostacolo alla valutazione ed all'interpretazione dei trend delle resistenze negli allevamenti, necessari per impostare strategie di controllo del fenomeno. Esperienze di altri paesi comunitari che hanno progressivamente ridotto il volume totale di antimicrobici nelle produzioni suine (es. beta-lattamici, macrolidi), dimostrano che parallelamente i trend di resistenze si sono significativamente ridotti nel tempo. L'uso degli antibiotici in modo "prudente" o "giudizioso" non è favorito dal fatto che tuttora risultano la risorsa economicamente meno impegnativa e più immediata per limitare problemi in allevamento, anche qualora dovessero derivare da management e carenze strutturali e non adeguate pratiche di allevamento o veterinarie (5). Politiche di incentivazione delle produzioni animali a ridotto impiego di antimicrobici sono attualmente allo stato di proposta all'interno della Commissione e potrebbero costituire un ulteriore vantaggio se affiancate a politiche adeguate e ragionate di registrazione, uso controllato, restrizione, e vigilanza sull'utilizzo degli antimicrobici al di fuori della normativa nazionale e comunitaria vigente.

ACKNOWLEDGEMENTS:
L'autore ringrazia il personale della Direzione Operativa Diagnostica Generale, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, per il supporto tecnico fornito: Alessia Franco, Gessica Cordaro, Paola Di Matteo, Manuela Iurescia, Fabiola Feltrin, Luigi Sorbara, Carmela Buccella, Alessandra Di Egidio, Cinzia Onorati, Roberta Onorati, Valentina Donati, Serena Lorenzetti, Tamara Cerci, Roberta Amoruso.

Bibliografia:
1. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Infect Dis. 2005;11:1965–6.
2. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol. 2008;128:298–303.
3. Official Journal of the European Union. COMMISSION DECISION 55/2008 of 20 December 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of Salmonella spp. and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in herds of breeding pigs to be carried out in the Member States.http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:014:0010:0025:EN:PDF (accessed on 6 february 2009)
4. European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902269834.htm Accessed February 16 2009.
5. WVA/IFAP/COMISA WORKING GROUP (1999) Prudent use of antibiotics: global basic principles. http://www.poultry-health.com/library/antimicrobials/wvacoifa.htm Accessed February 16, 2009

VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN BATTERI ENTEROPATOGENI DA UOMO E SUINO

MIRELLA PONTELLO

Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Sanità Pubblica – Microbiologia - Virologia

Il tema che mi è stato affidato è caratterizzato da un grande complessità in considerazione di una serie di elementi in gioco, riconducibili a tre categorie: [1)] la diversità delle specie batteriche, commensali o patogene per l'uomo e/o per l'animale; [2)] la diversità dei composti antimicrobici utilizzati/utilizzabili in medicina umana e/o zootecnia e in medicina veterinaria; [3)] la diversità dei meccanismi di resistenza, sia naturali che conseguenti a mutazioni o ad acquisizione di materiale genetico. Tale complessità, documentata da un'ampia letteratura scientifica (Tabella 1), viene qui descritta esaminando i seguenti punti:

1. premesse: i termini del problema
2. definizioni e meccanismi
3. la prevalenza e la diffusione delle resistenze
4. associazione tra uso degli antimicrobici in zootecnia e comparsa delle resisten ze
5. le criticità e le contestazioni
6. uno studio italiano
7. note conclusive

1. Premesse: i termini del problema

L'introduzione di composti antimicrobici in medicina umana e in veterinaria ha rappresentato uno delle più significative conquiste del XX secolo, tuttavia molto rapidamente è emerso il problema delle resistenze derivanti dalla pressione selettiva esercitata con l'uso ed abuso dei diversi composti nei due ambiti: quello clinico per la cura e la profilassi delle infezioni nell'uomo e quello agricolo-zootecnico per il trattamento degli animali (1, 6, 24, 25). Si deve anche considerare che molti composti usati per il trattamento degli animali sono strettamente correlati a quelli impiegati in medicina umana: β-lattamici (penicillina e cefalosporine), sulfamidici con o senza trimetoprim, tetracicline, macrolidi, lincosamine e streptogramine, chinolonici e fluorochinolonici. In termini quantitativi il consumo di antimicrobici (termine preferibile rispetto al "vecchio" termine "antibiotici") è rilevante (12, 25, 34, 35, 41); tra i tanti citiamo solo alcuni dati

- nell'Unione Europea nel 1997 sono state impiegate 5400 tonnellate di composti antimicrobici in medicina umana e 3949 tonnellate per la salute degli animali (terapia - prevenzione – controllo) e1599 tonnellate come promotori di crescita; da questi dati si calcola un consumo pari a 54 mg/kg negli uomini e 241 mg/kg negli animali[1];
- nell'unione Europea, dopo il bando dell'uso degli antibiotici quali promotori di crescita (1999) si è osservato un incremento del consumo a scopo terapeutico:

[1] *tetraciclina 66%, macrolidi 12%,* β*-lattamici 9%, aminoglicosidci 4%, sulfamidici 2%, fluorochinolinici 1%*

da 383 t nel 1999 a 437 t nel 2000; soprattutto per il trattamento dei suini il composto coinvolto in questo incremento (+116%) è la tetraciclina, seguita da macrolidi e lincosamine (+88%) e dagli aminoglicosidici (+ 68%).
- negli USA si stima che 80% delle produzione di composti antimicrobici sia utilizzato in agricoltura.

In ambito zootecnico gli antimicrobici sono impiegati per i seguenti diversi scopi (1, 25 ,35):
- terapia: trattamento delle infezioni in animali clinicamente malati;
- metafilassi: trattamento di animali clinicamente sani appartenenti ad un allevamento dove sono presenti animali malati;
- prevenzione/profilassi: trattamento di animali sani ma esposti al rischio per prevenire l'insorgenza di malattie (periodi di stress);
- controllo: somministrazione di antibiotici ad animali sani in allevamenti in cui la morbosità/mortalità eccede la norma;
- promozione della crescita: addizionamento continuo di anti-microbici nei mangimi per migliorare la crescita (+ 4-5% del peso).

All'utilizzo così esteso di composti antimicrobici è stato attribuita la comparsa di stipiti batterici resistenti agli antimicrobici, isolati dagli allevamenti, da ambienti contaminati da liquami provenienti da allevamenti come pure dagli alimenti di origine animale e da soggetti addetti al settore agricolo (8, 37). Parimenti è emersa la grave diffusione di stipiti resistenti in ambiente ospedaliero (specie patogene ed opportuniste). D'altronde si può ricordare che già nel 1946 Alexander Fleming, scopritore del primo antibiotico, la penicillina, aveva previsto il problema: "*There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by some way acquiring "fastness"* [resistance] e, attraverso una ricchissima letteratura, si può arrivare alla recente affermazione di Alekshun and Levy (2007) "*The means that microbes use to evade antibiotics certainly predate and outnumber the therapeutic interventions themselves.*" (3). Tutto questo ha innestato, a partire dagli anni '60, la discussione sull'uso di composti ad azione antimicrobica in medicina umana e in agricoltura ed ha portato ad un grande impegno del mondo scientifico per studiare il fenomeno della resistenza e, quindi, per mettere a punto strategie atte a limitarne la diffusione, strategie sostenute anche da decisioni di carattere normativo (12, 38, 39, 40).

2. Definizioni e meccanismi

Che cosa si intende per resistenza? La Tabella 2 riporta alcune definizioni del termine resistenza o stipite resistente: come si può notare le definizioni hanno, per certi aspetti, carattere relativo, in funzione dell'efficacia dei composti antimicrobici alle concentrazioni che sono raggiungibili in terapia umana.

I meccanismi che sono alla base delle resistenze possono essere di tipo intrinseco od acquisito (2, 3, 13, 24, 27, 29, 37) ; in questo secondo caso le resistenze, emergenti più facilmente in situazioni di pressione selettiva, sono attribuibili o a mutazioni o al trasferimento orizzontale (da una cellula ad un'altra) di determinanti di resistenza mediante trasferimento, coniugazione, transduzione; si definisce, invece, traslocazione il passaggio dei caratteri di resistenza da un sito ad un altro nella stessa cellula (per esempio da un plasmide al cromosoma batterico) (figura 2). La diffusione del fenomeno nel mondo microbico è reso ancor più complesso dalla varietà e mobilità degli elementi portatori delle basi genetiche della resistenze stesse, qui di seguito breve descritti:

- **plasmidi**: contengono geni codificanti per la resistenza ed altri caratteri, si replicano indipendentemente dal cromosoma; in una cellula batterica possono essere presenti più plasmidi;
- **transposoni**: elementi genetici mobili che possono essere inseriti in plasmidi o integrati nel cromosoma della cellula ospite; codificano per i fattori necessari alla loro self-translocazione (enzima transposasi);
- **transposoni coniugativi**: in grado di facilitare la loro self-traslocazione attraverso l'azione di elementi denominati IS (*Insertion Sequences*) ed il trasferimento di plasmidi da un microrganismo a un altro;
- **integroni**: contengono collezioni di geni (*gene cassettes*) e sono classificati in base alla sequenza di proteine integrasi cui si deve la funzione di ricombinazione. Queste complesse configurazioni vengono anche denominate "*antimicrobial resistance islands*" (es. multidrug antibiotic resistance di S.Typhimurium DT104);
- **super-integroni**: contengonoe centinai di gene *cassettes* (circa 3% del genoma della cellula ospite).

  I meccanismi d'azione (25) dell'antimicrobico ed i meccanismi di resistenza per le principali classi di composti sono riferiti nella tabella 4. Considerando solo il genere *Salmonella* sono stati riconosciuti – come riferito da Michael (26) in una recente revisione - diversi geni, anche a diversa locazione (plasmidica, cromosomica, ecc.), per la stessa resistenza:

  alla tetraciclina: 5 geni
  al cloramfenicolo: 8 geni
  all' aminoglicosidico-adeniltransferasi: 16 geni
  all' aminoglicosidico-acetiltransferasi: 5 geni
  all'aminoglicosidico-fosfotransferasi: 3geni
  al trimetroprim:13 geni
  ai sulfamidici: 3 geni.

3. La prevalenza e la diffusione delle resistenze attraverso la catena alimentare

In molti Paesi sono stati attivati dei sistemi di sorveglianza che consentono di monitorare la diffusione delle resistenze attraverso la filiera alimentare, la prevalenza dei diversi pattern di resistenza (mono e soprattutto multi-resistenze) ed i relativi trends nei diversi settori (Figura 1, Tabella 3) (11, 18, 23, 34).

Per quanto riguarda le modalità del passaggio dei caratteri di resistenza dal serbatoio animale all'uomo si distinguono due diversi casi (8, 14, 15, 16, 41) (figura 3 e 3 bis):

- la possibilità che stipiti batterici resistenti presenti in food *animals* possano portare alla presenza di stipiti resistenti commensali nell'intestino umano, che tuttavia non causano infezione ma persistono nel tempo e si trasmettono da uomo a uomo; occasionalmente batteri commensali resistenti possono determinare infezioni opportunistiche;
- la possibilità che ciò avvenga attraverso l'aumento della frequenza di stipiti zoonotici resistenti (*Salmonella e Campylobacter*), che tuttavia solo raramente sono trasmessi da uomo a uomo: in questo caso la prevalenza delle resistenze è direttamente correlata alla prevalenza delle resistenze negli animali (*animals food*).

4. L'impatto sulla salute umana

Definire l'impatto sulla salute umana implica la risposta a due domande:[i] quanto è dimostrata l'associazione e[ii] quali sono le conseguenze clinicamente rilevabili? (4, 5, 6, 8)

[i] Il passaggio delle resistenze dall'animale all'uomo, condizionato dalla pressione selettiva esercitata con il trattamento degli animali per vari scopi e coinvolgente sia specie patogene per l'uomo che specie abitualmente commensali, è senz'altro plausibile, ma quali osservazioni lo hanno documentato? in quale misura può essere considerato un fenomeno dimostrato nella realtà? In letteratura (5, 29) l'associazione tra l'uso di agenti antimicrobici in *food animals* e le resistenze nei batteri isolati dall'uomo è stata documentata attraverso diverse strade:

a. attraverso indagini sugli eventi epidemici (17, 28)
b. attraverso indagini epidemiologiche sulle infezioni sporadiche (5)
c. con studi sul campo (5)
d. attraverso case-reports (17)
e. evidenziando associazioni ecologiche e temporali (5)
f. utilizzando subtipizzazioni molecolari che consentono di paragonare stipiti di fonte umana e non (14).

In questa sede, per essere sintetici, possiamo solo riferire nella Tabella 5 alcuni esempi per ciascuno di queste strade.

[ii] L'assunzione di antimicrobici, per qualsiasi motivo, provoca effetti di tipo competitivo e selettivo sulla microflora intestinale (Tabella 6) (19); più esattamente si considera:

- effetto competitivo quello derivante dalla diminuita resistenza alla colonizzazione da parte di stipiti sia resistenti che sensibili quando il farmaco è preso prima dell'esposizione al patogeno
- effetto selettivo quello che si osserva quando il farmaco è somministrato durante l'esposizione all'agente patogeno: in questo caso si avrà un effetto preventivo solo se il patogeno è sensibile a quel composto, la flora "normale" verrà inibita, mentre il patogeno resistente sarà in grado di provocare infezione anche con bassa carica infettante.

Le conseguenze clinicamente rilevabili della diffusione di stipiti resistenti sono sia di tipo quantitativo sia qualitativo (5, 8, 9, 18, 20, 21, 22 , 29, 35): infatti, da una parte è documentata l'insorgenza di un eccesso di casi, cioè la comparsa di infezioni che altrimenti non si sarebbero verificate se lo stipite non fosse stato resistente, dall'altra si verifica una maggiore gravità delle infezioni, in termini di maggiore durata della fase clinica, incremento del tasso di ricovero e maggiore rischio di fallimento del trattamento, associato ad una limitata scelta degli agenti terapeutici; queste conseguenze sono state in particolare correlate alle infezioni di origine alimentare, sostenute da ceppi resistenti in pazienti trattati con antibiotici per qualsiasi altra ragione.

Per quanto riguarda l'eccesso di casi correlato al contagio con ceppi resistenti, Barza et all. (9) attraverso una metanalisi hanno valutato l'incremento di rischio di trasmissione per le persone in trattamento antibiotico per qualsiasi motivo, definendo la "frazione attribuibile" (*attributable fraction)*, calcolata come proporzione delle infezioni che non sarebbero insorte se lo stipite non fosse stato resistente (o se la persone non avesse assunto antibiotici per motivi non correlati): su 6 studi selezionati dagli autori l'OR cumulativo, per i soggetti in trattamento con un antibiotico verso il quale il patogeno sia resistente, è risultato pari a 3,7 (95% CI 2,7-5,0). In termini di *risk assessment* è stato anche stimato

che ogni anno negli USA si verificherebbero almeno 29.379 casi di infezioni da *Salmonella* spp., con 342 ricoveri e 12 morti per ceppi resistenti derivanti da *food animals*; per le infezioni da *Campylobacter* la resistenza negli animali contribuirebbe a 17.668 casi e 95 ospedalizzazioni.
La seconda conseguenza clinica riguarda l'evoluzione dell'infezione, sia in termini di maggiore durata e gravità sia di possibile insuccesso della terapia; dei numerosi dati pubblicati in letteratura ne citiamo alcuni, a titolo esemplificativo, attestanti:

- la maggiore durata della malattia:
  - in diversi studi (Tabella 7) è stato osservato un significativo incremento della durata della fase clinica dell'infezione sostenuta da stipiti di *Campylobacter* spp. resistenti ai fluoro-chinolonici (29);
  - in uno studio prospettico in Danimarca nel 2004 (15) la durata media della malattia è risultata maggiore per gli 86 pazienti con infezione da C. *jejui* resistente ai chinolonici (mediana 13.2 giorni rispetto ai 381 pazienti con infezione da ceppi sensibili ai chinolonici (mediana 10.3 days, p = 0.001); non è invece stata osservata un'associazione tra il trattamento con composti fluoro-chinolonici prima della raccolta del campione di feci e la presenza di infezione da ceppo resistente di C. *jejuni*
- la maggiore severità dell'infezione (cioè tasso di ospedalizzazione, esito sfavorevole, insuccesso terapeutico):
  - uno studio a cura dei CDC (1989-90) su 758 casi sporadici di salmonellosi (5) ha evidenziato che pazienti con infezioni dovute a stipiti resistenti hanno maggiore probabilità di essere ricoverati in ospedale rispetto a quelli infetti da stipiti sensibili (*P = .006*);
  - lo studio del *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*, USA (NARMS) (36) ha nesso in evidenza che l'ospedalizzazione per infezione setticemica si verifica più frequentemente nei soggetti infetti con stipiti resistenti ad almeno uno degli antimicrobici clinicamente importanti rispetto ai soggetti con infezioni sostenute da germi sensibili (OR aggiustato, 3.1; 95% CI, 1.4–6.6); una analoga e significativa differenza - ancora secondo i dati del NARMS (USA 1996-2001) - risulta per le infezioni invasive, sistemiche, da sierotipi di *Salmonella* non tifoidei [OR], 1.6; 95% confidence interval [CI], 1.2–2.1); la figura 6 e la tabella 8 descrivono con maggiore dettaglio lo studio NARMS;
  - uno studio svolto in Danimarca, (1996-2000), analizzando i dati riportati sui registri dei sistemi di sorveglianza e aggiustando i dati per sesso, età, patologie concomitanti (*comorbidity*), ha documentato che su 1323 pazienti infetti da Salmonella sierotipo Typhimurium, l'infezione da stipiti resistenti ai fluo-chinolonici è associata al rischio di forme invasive o esito letale 3,15 volte maggiore (95% CI 1.39–7.10) rispetto ai casi di infezione da ceppi pan-suscettibili (frequenza delle forme invasive o morte: 8,86% v.so 4,42%) . Lo stesso studio documenta che pazienti infetti da stipite di *Campylobacter* resistente ai chinolonici hanno un rischio 6 volte maggiore di andare incontro ad un evento avverso (*"adverse event"* definito come : *"invasive illness or death, within 90 days of the date of receipt of samples"*) rispetto ai soggetti infetti con ceppi suscettibili ai chinolonici e all'eritromicina (21, 22);
  - il rapporto della prima epidemia nella popolazione generale (*"community outbreak"*) in Danimarca dovuta a *Salmonella* DT 104 (1998) riferisce che lo stipite isolato dai 25 casi confermati era resistente all'acido nalidixico e aveva una ridotta suscettibilità

ai fluoro-chinolonici, undici pazienti sono stati ricoverati in ospedale e per due casi l'esito è stato letale; con l'epidemiologia molecolare è stata dimostrato la sorgente di infezione era un allevamento di suini e le indagini hanno suggerito una ridotta efficacia clinica del trattamento con fluorochinolonici (28);

- l'eccesso di mortalità associata all'infezione da stipiti di *Salmonella* Typhimurium resistenti all'ampicillina, al cloramfenicolo, alla streptomycina, ai sulfonamidici, e alla tetraciclina è evidenziata da un altro studio danese: i pazienti infetti da stipiti con questo spettro di poliresistenza hanno 4.8 volte (95% CI 2.2 to 10.2) maggiore probabilità di morire mentre l'infezione da stipiti resistenti ai chinolonici è associata ad un rischio di mortalità 10.3 più grande di quella osservata nella popolazione generale (20).

Accanto ai dati pubblicati sulla letteratura scientifica non mancano autorevoli prese di posizione delle autorità internazionali, che testimoniano un sostanziale accordo sull'esistenza di un nesso tra l'uso degli antimicrobici nei food-animals e l'emergenza e la diffusione di batteri resistenti, in particolar modo d'agenti trasmissibili all'uomo quali *Salmonella e Campylobacter* (38, 39, 40). Riportiamo alcune affermazioni a cura di WHO *Consultations* e della *Codex Alimentarius Commission:*

Berlin meeting 1997 - WHO Consultation on the Medical Impact of Anti-microbial Use in Food Animals': "There is direct evidence that anti-microbial use in animals selects for anti-microbial-resistant non-typhoid Salmonella serotypes. These bacteria have been transmitted to humans in food or through direct contact with animals"
Geneva meeting 1998 "Use of Quinolones in food Animals and potential impact on Human Health': "the use of fluoroquinolones in food animals has led to the emergence of fluoroquinolone-resistant Campylobacter and of Salmonella with reduced susceptibility to fluoroquinolones"
Codex Committee on Food Hygiene 2001: "This use is the principle contributing factor to the emergence and dissemination of anti-microbial resistance among bacterial pathogens and commensals that have food animal reservoirs"
Codex Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, 2001-13th session: "Animals serve as reservoirs for food borne pathogens, including Salmonella and Campylobacter. Antibiotic resistant food borne pathogens may be present in and on animals as a result of drug use in animals. These resistant food borne pathogens may contaminate a carcass at slaughter and can be transmitted to humans through consumption and handling of contaminated food. In industrialized countries, the food borne pathogens, Salmonella and Campylobacter, are infrequently transferred from person to person. In these countries, epidemiological data have demonstrated that a significant source of antibiotic resistant food borne infections in humans is the acquisition of resistant bacteria originating from animals that is transferred on food."

Da queste considerazioni, con l'obiettivo di impedire/ridurre l'impatto dell'uso degli antimicrobici in zootecnia sono state anche fissate delle norme:

il WHO / 1997–1999 raccomanda di interrompere l'uso di antimicrobici come fattori di crescita se corrispondo o se rappresentano composti appartenenti a classi di antimicrobici utili in patologia umana;
l'Unione Europea / 2001 bandisce l'uso - come promotori di crescita – dei seguenti antibiotici: avoparcina, tilosina, spiramicina, bacitracina, virginiamicina;
in ambito zootecnico i Paesi Membri UE dal 2006 devono interrompere l'uso degli antimicrobici come promotori di crescita.

A queste decisioni corrispondono delle conseguenze anche di segno contrastante (11, 12); esemplifichiamo:

conseguenze favorevoli

- Svezia: già sospeso l'uso dal 1986: risultati competitivi a livello di produzione e conseguente riduzione della prevalenza delle resistenza in stipiti isolati da animali, alimenti, uomo;
- Danimarca: non effetti sfavorevoli per i profitti degli allevatori e per lo stato di salute dei polli (*broiler chickens*);

viceversa:

- in Europa non diminuisce, anzi aumenta la prevalenza della resistenza alla vancomicina negli enterococchi isolati da infezioni nell'uomo (negli USA alta prevalenza di VRE in assenza di uso dell'avoparcina negli animali);
- in Europa si osserva l'aumento dell'uso terapeutico degli antimicrobici nei *food animals* (da 383 tonnellate nel 1999 a 437 nel 2000);
- in Danimarca: per un maggiore impiego terapeutico, si registra un aumento della resistenza a tetraciclina e sulfamidici sia in ceppi di origine suina che in quelli isolati dall'uomo;
- In Danimarca è anche riferito un aumento nei suini della morbosità e mortalità per infezioni enteriche, ecc. con conseguente aumento dell'uso terapeutico di antibiotici (+ 116% per Te, + 8% per macrolidi, + 68% per aminoglicosidici a dispetto dei tentativi di migliorare le condizioni igieniche degli allevamenti.

5. Le criticità e le contestazioni

Tutto quanto sopra riportato può suggerire l'idea di una ormai ben documentata documentazione a sostegno della responsabilità del mondo zootecnico nel travasare – quasi meccanicamente – le resistenze dall'animale all'uomo; tuttavia, trattandosi di un fenomeno biologico così complesso e condizionato da una così ampia serie di variabili, il mondo scientifico non appare oggi del tutto concorde sulla questione. Alcuni Autori (7, 33) ridimensionano o contestano il pur vario pannello delle prove a favore del ruolo che il trattamento antimicrobico degli animali avrebbe nell'insorgenza delle resistenze nell'uomo: l'impatto dell'uso di antimicrobici in veterinaria si verificherebbe in una fase precoce e complessivamente sarebbe sovrastimato, mentre non si terrebbero in dovuta considerazione altri elementi come l'uso di composti antimicrobici per gli animali di affezione[2]; Smith et al. (33), attraverso al costruzione di modelli matematici (Figura 6, curve A, B, C) hanno concluso che

- A. *Animal Antimicrobial Use (AAU) does not change the equilibrium prevalence dramatically, but it does cause AR to invade 3 years sooner. The cumulative excess prevalence is the area between these two curves. The medical consequences*

[2] *"Our analysis suggests that animal antibiotic use hastens the appareance of antibiotic resistant bacteria in humans. Our model indicates that the greatest impact occurs very early in the emergency of resistance , when antibiotic resistant bacteria are, possibly below detection limits of current surveillance methods" (a).; "We suggest that the role of food-producing animals in the origin and transmission of antimicrobial resistance and foodborne pathogens has be overestimated and overemphasized in the scientific literature; consequently, non foodborne transmission, including pet-associated human cases has been underemphasized." (b)*

of AAU are contrasted with a 50% increase in the rate of MAU (= Medical Antibiotic Use dashed line). Increasing MAU use makes resistance invade earlier and reach a higher equilibrium.

- B. *The equilibrium prevalence is very sensitive to changes in the rate of MAU (ρ, solid line) relative to changes in the rate of exposure caused by AAU (λ,dashed line)*
- C. *The cumulative excess prevalence caused by AAU declines dramatically if exposure resulting from AAU is delayed. The longer AAU is delayed, the lower the impact. The units are scaled to the maximum impact. Each point, t, represents a numerical simulation identical to the top panel in every way except one. For each point, λ = 0 before t.*

Riferiamo brevemente, con alcune sottolineature, le posizioni critiche più significative:

Smith et al. (33) ritengono che le misure restrittive nell'uso degli antimicrobici siano più efficaci quando il fenomeno della resistenza sia raro:
"One solution might be to regulate animal antibiotic use (AAU) before antibiotic resistance (AR) becomes a problem in medicine and then allow prudent AAU once clinically significant resistance has already developed. This solution represents the opposite conclusion from a proposed regulatory concept in which drug use would be allowed until AR exceeds a threshold. This threshold concept may be an ineffective tool for managing commensal AR bacteria because once resistant bacteria are detected, much of the damage has been done. Thresholds may be useful for organisms such as Campylobacter and Salmonella but not AR in enterococci. In commensal bacteria with the potential for epidemic spread, small increases in prevalence when AR is extremely rare can initiate epidemics which may have large consequences. We are skeptical that a threshold in humans could be set low enough to effectively prevent the adverse effects of AAU."

Barber e coll.(7), di cui riportiamo parte dell'abstract:
"Antimicrobial resistance is an issue of increasing global concern. Several investigators have suggested that antibiotic use in food-producing animals is a major contributor to the increasing incidence of antimicrobial-resistant organisms causing illness in humans (…) We suggest that the role of food-producing animals in the origin and transmission of antimicrobial resistance and "foodborne" pathogens has been overestimated and overemphasized in the scientific literature; consequently, nonfoodborne transmission, including pet-associated human cases, has been underemphasized. Much evidence exists for the potential contribution to infectious disease that may be of human or pet origin (that may contact humans through food but not be of a food origin)."

Phillips et al. (31):
"Resistance is equally likely to diminish in prevalence when antibiotic use is decreased or discontinued, since although individual strains may retain resistance genes, they are often replaced by susceptible strains when the selective pressure is removed. There is now evidence that both of these phenomena have occurred in enterococci in Europe in relation to the use and discontinuation of use of growth-promoting antibiotics ….There is evidence from the USA and from Norway that some resistance may persist long after the use of an antibiotic has been discontinued. The persistence of virginiamycin resistance after its ban has been attributed to the use of penicillin selecting for associated resistance to virginiamycin.…

most of the studies of the food chain ignore the fact that there are potential sources of resistant enterococci and Enterobacteriaceae other than farm animals given antibiotics …
Wild animals, especially rodents, and birds, especially gulls, can acquire these environmental contaminants …Vegetables may also be contaminated from sewage, especially in countries in which human faeces is used as a fertilizer. . …Fish farming involves the use of antibiotics …are widely used to prevent bacterial diseases in plants: tetracyclines and aminoglycosides are used to protect fruit trees from fire blight …Genetic engineering in plants involves the use of a variety of antibiotics including vancomycin. …
We are aware of no rigorous epidemiological studies of such potential reservoirs, and the assumption that they make negligible contributions to human enteric pathogen resistance is unfounded."
"The simple (and it is now simple) demonstration that two genes are indistinguishable, or even truly identical, tells us nothing of the source of infection or its route of transmission or the dynamics of carriage without a study of temporal and spatial relationships. In many reported studies, such considerations are totally absent …"

e ancora Philipps et al. (31),considerano specificamente il caso delle resistenze in *Salmonella, Campylobacter,* Enterococchi*, E.coli:*

- Salmonella: *"Clearly, resistance may be selected in salmonellae in animals given antibiotics, but this does not necessarily mean that the resistance arose in animals …*
  It is neither necessary nor sufficient for an epidemiologically successful Salmonella to be antibiotic-resistant, although they may have an advantge when antibiotics to which they are resistant are being used for other purposes"…
- Campylobacter:
  "Most early studies that defined chicken as a risk factor did not consider restaurant dining and commercial food preparation as an explanation or as a confounder. …clear that chicken prepared and eaten at home has a statistically negative association with campylobacter risk, … Once venue is taken into account, chicken is no longer a risk factor …Even if types are identical, they could have been acquired by both from a third unidentified source. "… fluoroquinolone resistance has been encountered in human isolates in countries in which fluoroquinolones are not approved for use in food animals, such as Sweden, Finland and Canada. Finally, it has been observed in Sweden that animal isolates may be fluoroquinolone-resistant in the absence of animal use of the fluoroquinolones… "
  "The case for erythromycin resistance being selected in animals is even more difficult to assess since macrolides have been used for therapy and growth promotion in animals and in human therapy over decades. Macrolide use in human medicine is generally increasing …Human campylobacter infection is usually confined to the intestine, and antibiotic therapy is usually not needed. As with salmonellosis, …, the risk to human health from campylobacters that might have acquired their resistance in animals is probably very small. …banning of growth promoters, including macrolides, is likely to have little effect on resistance in campylobacters from humans, and no effect on human medicine."

- Enterococchi:
  10 factors militate against the assumption that the tiskto humans arising from resistant animal enterococci is real"
  di questi 10 fattori ne segnaliamo solo uno:
  "A very important consideration is the degree of host-animal specificity among enterococci. Under experimental conditions, it has proved impossible to establish animal strains in humans who have swallowed large inocula of VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) and conversely to establish strains of human origin in animals, although, in experiments, animal strains may pass through the human intestine, multiply to a limited extent, and exceptionally be excreted for periods of up to 2 weeks. … Using amplified length polymorphism analysis, they found that clinical isolates from hospitalized patients from several European centres resembled those from cats and dogs and some veal calves (subtype C), but, to their surprise, differed from faecal isolates from non-hospitalized human subjects, whose isolates resembled those of pigs (subtype A). Turkeys and chickens and their farmers had subtype B whereas most veal calves and their farmers had subtype D."
- E.coli:
  "colonization with animal E. coli is transient and animals are not an important source of resistant coliforms.
  …
  "These susceptibility patterns support the hypothesis that resistance in E. coli is more likely to be driven by human antibiotic use, although an animal origin for at least some clinical isolates cannot be excluded (leaving aside the case of O157). It is intriguing that antibiotic-resistant E. coli has been isolated in rural areas from wild rodents in the UK.
e per finire, in tema di effetti del bando dell'uso degli antimicrobici in Europa, citiamo il parere critico di Casewell et al. (12):
  "Following the ban on all growth-promoting antibiotics in Sweden in 1986, and the ban on avoparcin and virginiamycin in Denmark in 1995 and 1998, the European Union (EU) banned the use of avoparcin in 1997 and the four remaining antibiotics used for growth promotion in 1999, on the basis of the 'Precautionary Principle'. These four antibiotics were bacitracin (a polypeptide), spiramycin and tylosin (macrolides), and virginiamycin (a streptogramin combination). …
  Experience in Sweden had already shown that the bans might have adverse consequences for animal health and welfare, and economic consequences for farmers. There were also suggestions that human health is unlikely to benefit and that it might even be adversely affected …"
  Consequences for human infection
  "The only attributable effect on humans has been some diminution in vancomycin resistance in enterococci isolated (VRE) from human faecal carriers…However, despite the growth promoter ban and the reduction of carriage of resistant enterococci in animal and human faeces, there has been no diminution in the prevalence of resistant enterococcal infection in humans "

8. Uno studio italiano

Sottolineando che tutto ciò che è stato riportato nei paragrafi precedenti non esaurisce la ricchezza della letteratura sul tema che abbiamo affrontato e prima di tirare le con-

clusioni, citiamo anche una dato "nostro", di recente pubblicato (32). Si tratta di uno studio condotto in collaborazione con l'IZS di Brescia, che ci ha permesso di studiare i caratteri di resistenza in stipiti di *Salmonella* spp. isolati dalle filiere avicola (2% di campioni positivi) e suinicola (5,5%); gli stipiti appartenenti a diversi sierotipi-pulsotipi sono risultati poliresistenti nel 76% dei casi (13/23 e 73/90 ceppi rispettivamente nelle due filiere). Sugli stipiti multiresistenti (MDR) si è indagata la trasferibilità - ottenuta nel 25,6% dei casi - e le basi genetiche delle resistenze: 73,3% degli stipiti MDR veicolano plasmidi; in 14 casi sono presenti integroni di classe 1. Abbiamo confrontato i dati osservati con quelli della letteratura, evidenziando similitudini e differenze (Tabella 9).

9. Note conclusive

La complessità del fenomeno che abbiamo cercato di illustrare è rappresentata in figura 7 (25, 26). Gli elementi in gioco sono numerosi e s'intersecano a vicenda, ma possiamo stabilire qualche punto fermo:

- negli animali come nell'uomo l'uso degli antimicrobici causa un incremento delle resistenze sia in microrganismi patogeni sia nella flora endogena;
- più è alto il numero di stipiti resistenti nell'intestino e maggiore sarà la probabilità di trasferimento a stipiti patogeni;
- la prevalenza osservata negli stipiti patogeni è solo la punta dell'iceberg;
- la letteratura non ci permette di quantificare esattamente il contributo dell'uso degli antimicrobici in zootecnia al problema delle resistenze in medicina umana, ma certamente un legame esiste;
- dovendo affrontare il grave problema delle multiresistenze in ambito clinico, con limitata disponibilità di composti attivi, ogni fonte di resistenza deve essere efficacemente controllata;
- conseguentemente un basso livello di prevalenza delle resistenze nella flora intestinale degli *food animals* deve essere considerata un distintivo marcatore di qualità e sicurezza (e questo può salvaguardare anche l'efficacia delle terapie antimicrobiche in veterinaria);

  ed alcune indicazioni per poter contenere il consumo d farmaci antimicrobici in zootecnia e, quindi, la diffusione delle resistenze:

- miglioramento dei metodi di allevamento,
- eradicazione delle malattie infettive,
- eventuale uso di vaccini,
- se l'uso degli antimicrobici è necessario, preferire quelli a limitato spettro di azione,
- non usare antimicrobici come promotori di crescita, favorendo mezzi alternativi (pre- e probiotici).

Accanto a questo non si può trascurare il ruolo delle attività di sorveglianza: sono utili per monitorare ciò che accade sul campo, ma non è detto che l'osservazione dei fenomeni sia sufficientemente tempestiva; inoltre, è necessario definire criteri di campionamento, che tengano conto della complessità dei fattori in campo. La sorveglianza non può limitarsi a raccogliere dati ed a calcolare la prevalenza delle resistenze, ma deve comprendere anche un'intelligente capacità di valutarle ed interpretare i fenomeni osservati, senza eccedere in allarmismi, ma anche pesando gli elementi di rischio.

Bibliografia

1. Aarestrup F.M. (2005) "Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin". Basic & Clinical Pharmacology; 96: 271-281
2. Alcaine SD, Warnick LD and Wiedmann M. (2007) "Antimicrobial resistance in non typhoidal *Salmonella*". J Food Prot; 70: 780-790
3. Alekshun M.N. and Levy S.B. (2007) "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance". Cell 23: 1037-1050
4. Angulo F.J., Johnson K.R., Tauxe R.V., Cohen M.L. (2000) "Origins and consequences of antimicrobial-resistant non typhoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals" Microb Drug Resist. 6: 77-83.
5. Angulo F.J, Nargund VN and Chiller TC. (2004) "Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human consequences of such resistance". J Vet Med B; 51: 374-379
6. Angulo F.J Baker NL, Olsen SJ Anderson A and Barrett TJ. (2004) "Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans". Seminars in Pediatric Infectious Diseases; 25: 78-85
7. Barber D.A., Miller G.Y., and McNamara P.E. (2003) "Models of antimicrobial resistance and foodborne illness examining assumptions and practical applications" JFP 66: 700-709
8. Barza M. (2002) "Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals". Clin Inf Dis; 34 (suppl 3): S123-S125
9. Barza M and Travers K. (2002) "Excess infections due to antimicrobial resistance: the "attributable fraction"". Clin Inf Dis; 34 (suppl 3) S126-S130
10. Butaye P, Miachael G.B., Schwarz S., Barrett T.J., Brisabois A., White D.G. (2006) "The clonal spread of multi-drug resistant non-typhi *Salmonella* serotypes" Microbes and Infections 8: 1891-1897
11. Bywater R., Deluyker H., Deroover E., de Jong A., Marion H., McConville M., Rowan T., Shryock T., Shuster D., Thomas V., Vallé M. and Walters J. (2004) "A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal acteria isolated from food-producing animals". J Antimicrobial Chemotherapy: 54: 744-754
12. Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P and Phillips I. (2003) "The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health". J Antimicrobial Chemotherapy; 52: 159-161
13. Cerniglia C.E. and Kotarski S. (2005) "Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora" . J Vet Pharmacol Therap; 28: 3-20
14. Chiu C.H., Wu T.L., Su L.H., Chu C., Chia J.H., Kuo A.J., Chien M.S. and Lin T.Y. (2002) "The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica serotype Choleraesuis*". NEJM; 346: 413-419
15. Engberg J., Neimann J., Nielsen M.E., Aarestrup F.M. and Fussing V. (2004) "Quinolone-resistant *Campylobacter* infections in Denmark: risk factors and clinical consequences". EID; 10: 1056-1063

16. FDA (2006) National Antimicrobial Resistance Monitoring System – Enteric Bacteria (NARMS): 2003 Executive report . U.S. Department of Health and Human Services, US food and Drug Administration , Rockville, MD
17. Fey P.D., Safranek T.J., Rupp M.E., Dunne E.F., Ribot E., Iwen P.C., Bradford P.A., Angulo F.J. and Hinrichs S.H. (2000) "Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle". NEJM: 342: 1242-1249
18. Foley S.L. and Lynne A.M. (2008) Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J. Anim. Sci. 86 (E. Suppl): E173-E187
19. Garau J., Xercavins M., Rodriguez-Carballeira M., Gomez-VeraJ.R., Col I., Vidal D., Llovet T., and Ruiz-Bremon A. (1999) "Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community". Antimicrob. Agents Chemother 43: 2736-2741
20. Helms M., Vastrup P., Gerner-Smidt P. and Mólbak K. (2002) "Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium". EID; 8: 490-495
21. Helms M,. Somonsen J., Olsen K.E.P. and Mólbak K. (2005) "Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study". JID: 191: 1050- 1055
22. Helms M., Simonsen J. and Mølbak K. (2004) "Quinolone Resistance is Associated with Increased Risk of Invasive Illness or Death during Infection with *Salmonella* Serotype Typhimurium" JID; 190:1652–1654
23. Hendriksen R. S, Mevius D.J , Schroeter.A., Teale C., Jouy E, Butaye P., Franco A., Utinane A., Amado A., Moreno M., Greko C., Stärk K.DC., Berghold C., Myllyniemi A.-L., Hoszowski A., Sunde M.and Aarestrup F.M. (2008) "Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 – 2004: the ARBAO-II study". Acta Vet. Scand. 50: 19
24. Khachatourians G.G. (1998) "Agricultural use of antibiotics and the evolution an transfer of antibiotic-resistant bacteria". CMAJ. 59 :1129-36
25. Mateu E. and Martin M. (2001) "Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well?" J Vet Med B; 48: 569-581
26. Michael G.B., Butaye P., Cloeckaert A., Schwarz S. (2006) "Gene and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update". Microbes and infection; 8: 1898-1914
27. Miriagou V., Carattoli A., Fannin g S. (2006) "Antimicrobial resistance islands :resistance gene lusters in *Salmonella* chromosome and plasmids". Microbes and infection; 8: 1923-1930
28. Mølbak K., Baggesen D.L., Aarestrup F. M., Ebbesen J. M., Engberg J., Frydendahl K., Gerner-Smidt P., Petersen A. M. and Wegener H.C. (1999) "An Outbreak of Multidrug-Resistant, Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104" NEJM 341:1420-1425
29. Mólbak K. (2004) "Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans. The public health consequences". J.Vet.Med. B; 51: 364-369
30. NCCLS. (2002) "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing". Twelfth Informational supplement M100-S12.NCCLS. Wayne, Pa

31. Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. and Waddell J. (2004) "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data". J Antimicrobial Chemotherapy; 53: 28-52
32. Romani C., Aleo A. , Pellissier N., Viganò A. e Pontello M. (2008) "Characterization of multi-drug resistance in *Salmonella* strains isolated from animals". Ann. Ist. Super. San 44: 292-300
33. Smith D.L., Harris A.D., Johnson J.A., Silbergeld E.K., Morris J.G. (2002) "Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria.". Proc. Nat. Am. Sc. 99:6434-6451
34. Ungemach F.R. (2000) "Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation". Acta Vet Scand 93: 89-97
35. Van de Bogaard AE and Stobberingh EE. (1999) "Antibiotic usage in animals. Impact of bacterial resistance and public health". Drugs; 58: 590-607
36. Varma J.K., Mólbak K., Barrett T.J, Beebe J .L., Jones T.F., Rabatsky-Ehr T., Smith K.E., Vugia D.J., Chang H-G. and Angulo F.J. (2005) "Antimicrobial resistant non typhoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hositalizations. JID; 191: 554-561
37. White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDermott P.F. (2002) "Antimicrobial resistance of foodborne pathogens". Microbes and Infections 4: 405-412
38. World Health Organization (WHO), 1997. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany,13-17 October 1997. WHO, Geneva, Switzerland
39. World Health Organization (WHO), 1998. Use of quinolones in Food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting, Geneva, Switzerland , 2-5 June 1998. WHO, Geneva, Switzerland
40. World Health Organization (WHO), 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO Consultation, 5-9 June, Geneva, Switzerland, Geneva, Switzerland, 2-5 June 2000. WHO, Geneva, Switzerland
41. Witte W. (1998) "Medical consequences of antibiotic use in agriculture". Science 279: 996-997

Tabella 1. PUB MED Risultati ricerca per key words.. Limiti: ultimi 5 anni, ricerca parola nel titolo e abstract

Combinazioni di parole chiave	Numero riferimenti
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + food animals	773
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + foodborne diseases	33
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + Salmonella	892
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + Salmonella Typhimurium	347
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + Campylobacter	228
antimicrobial resistance OR Multidrug resistance) + swine	331

Tabella 2. Definizioni dei termini "resistenza" o "stipite resistente" *

Definizioni	Fonti
Resistant isolates: *isolates that are not inhibited by usually achievable systemic concentration of the agent with normal dosage schedules and/or fall in the range where specific antimicrobial resistance mechanisms are likely and clinical efficacy has not be reliable in treatment study.*	NCCLS
Resistance: *The result of microbes changing in ways that reduce or eliminate the effectiveness of drugs, chemicals, or other agents to cure or prevent infections" o anche "Antimicrobial resistance is the ability of microbes, such as bacteria, viruses, parasites or fungi to grow in the presence of a chemical (drug) that would normally kill it or limit its growth."*	MedicineNet
Antimicrobial resistance *is the ability of microbes, such as bacteria, viruses, parasites, or fungi, to grow in the presence of a chemical (drug) that would normally kill it or limit its growth"*	National Institute of Health
Antimicrobial Resistance: *two definitions* • *Functional definition: organisms become resistant to antibiotics, leading to treatment failures.* • *Laboratory definition: organisms have elevated minimum inhibitory concentrations (MIC).* • *Definitions do not always match.*	CDC
Multi-Drug-Resistant-Organisms *(MDRO): microorganisms, predominantly bacteria, that are resistant to one or more classes of antimicrobial agents*	CDC Infection Control in Healthcare Settings

* **Siti consultati:**

a. http://www.clsi.org/
b. http://www.medicinenet.com
c. http://www.nih.gov/
d. http://www.cdc.gov
e. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/

Tabella 3. resistenze in stipiti di *E.coli* isolati da suini sani (colonne a) e da suini malati (colonne b) (23).

antibiotico	Danimarca		Francia		Spagna	
	a	b	a	b	a	b
ampicillina	33,2	45,8	22,0	53,2	69,9	72,2
amoxicillina'+ac clav.	1,0	0,6	-	2,0	0,0	1,8
apramicina	3,4	13,6	4,0	3,3	4,9	13,0
ceftiofur	0,0	0,0	-	0,6	0,5	3,6
cloramfenicolo	9,1	41,8	14,0	-	30,6	40,8
ciprofloxacina	0,0	2,9	1,0	5,5	3,3	14,2
florfenicolo	0,0	0,0	1,0	0,9	2,2	7,1
gentamicina	3,4	12,0	0,0	5,5	7,7	19,5
ac. nalidixico	3,4	32,0	3,0	-	20,8	33,7
neomicina	15,8	35,0	5,0	10,9	11,5	20,1
streptomicina	47,6	77,4	62,0	-	66,1	74,0
sulfonamide	46,6	82,0	-	-	73,2	76,3
tetraciclina	43,8	91,0	86,0	82,6	95,6	87,0
trimetoprim	-	-	44,0	-	66,7	66,9
trimetoprim+sulf.	49,0	48,6	-	55,0	72,3	-

Tabella 4. Meccanismi di azione e di resistenza ai principali composti antimicrobici (25)

Famiglia d'antibiotici	Meccanismo d'azione	Meccanismo di resistenza	Tipo di resistenza
β-lattamici e cefalosporine	Inibizione della formazione della parete batterica	β-lattamasi diminuzione permeabilità di membrana Alterazione del target	Acquisizione di DNA Mutazione
Aminoglicosidi	Inibizione della sintesi delle proteine (legame con ribosoma 30S)	Mutilazione del target ribosomale Modificazione enzimi	Acquisizione di DNA Mutazione
Macrolidi	Inibizione delle sintesi di proteine (legame con ribosoma 50S)	Metilazione 235 RNA	Acquisizione di DNA Mutazione
Tetracicline	nibizione della sintesi delle proteine (legame con ribosoma 30S)	Azione sul meccanismo di efflusso Alterazione unione Alterazione del target	Acquisizione di DNA Mutazione
Sulfamidici	Inibizione competitiva dell'acido para-aminobenzoico (PABA)	Riduzione up-take Alterazioni enzimi metabolici Incremento produzione PABA	Acquisizione di DNA Mutazione
Chinolonici	Impedimento dell'avvolgimento a spirale del DNA	Mutazioni dei geni target *gyrA e parC* Azione sul meccanismo di efflusso	Mutazione
Rifamicina	Inibizione RNA-polimerasi	Alterazione RNA-polimerasi	Mutazione
Glicopeptidi	Inibizione della sintesi della parete cellulare	Alterazione del target	Acquisizione di DNA Mutazione
Polimixina	Distruzione della membrana cellulare	Aumento permeabilità	Mutazione

Tabella 5. tipi di studi e relativi esempi a sostegno dell'associazione tra uso degli antimicrobici in zootecnica ed emergenza di resistenze negli stipiti isolati dall'uomo.(5)

Tipo di studio	Esempi in letteratura
a. indagini su eventi epidemici	• 1987 - epidemia da *Salmonella* resistente alla **tetraciclina** associata all'uso dell'antibiotico nei mangimi (*"top-dressing of cattle feed with tetracycline"*) • 1987 - epidemia da Salmonella **cloramfenicolo** resistente correlata ad un allevamento di animali da latte dove era stato illegalmente utilizzato l'antibiotico • 1987 - una review di epidemie da *Salmonella* indica che le epidemie da ceppi resistenti hanno maggior probabilità di essere associate ad alimenti di origine animale rispetto alle epidemie da stipiti sensibili • 2001 – *Salmonella* Typhimurium DT 104 resistente all'**acido nalidixico** associata ad un allevamento bovino dove erano stati usati i fluorochinolonici.
b. indagini su infezioni sporadiche	• 2004 Studio caso-controllo negli USA in soggetti infetti con *Campylobacter* resistente ai **fluorochinolonici** avevano maggiore probabilità di aver consumato pollo o tacchino • 2003 e 2004 - due studi caso controllo: è più probabile che i casi sporadici di infezione da *Salmonella* (S.Typhimurium DT104 e S.Newport) resistente abbiano visitato o vivano in ambiente rurale a contatto con gli animali rispetto ai soggetti infetti da ceppi sensibili
a. studi sul campo *(fields study)*	• aumento della resistenza alla tetraciclina in ceppi isolati da feci di pollame entro una settimana dall'introduzione della **tetraciclina** nei mangimi e quindi anche nei ceppi di *E.coli* isolati dalle feci dei soggetti addetti all'allevamento e loro familiari • l'uso della **nurseotricina** - una streptotricina non usata in terapia né umana né animale - come promotore della crescita in suini nella Germania Orientale provoca la comparsa di resistenza in diverse specie batteriche: coliformi, ma anche patogeni quali *Salmonella e Shigella*, isolati dagli animali e dall'uomo
c. case-report ^	• Isolamento da un bambino, figlio di un veterinario, di un ceppo di *Salmonella* sierotipo Typhimurium resistente a 13 composti tra cui il ceftriaxone, non distinguibile da un ceppo isolato da un animale; dall'allevamento, trattato a scopo terapeutico con ceftriaxone, sono stati isolati anche stipiti sensibili al ceftriaxone, alla PFGE simili a quelli resistenti
d. associazioni ecologiche e temporali	• correlazione tra quantità di composti antimicrobici usati in *food animals* e comparsa di resistenze in selezionate specie batteriche (cfr Danimarca - DANMAP, 2002) • associazione temporale tra l'approvazione dell'uso di un dato composto antimicrobico e comparsa delle resistenze in una data area (USA: *Campylobacter* e resistenza ai fluorochinolinici) • confronto ecologico tra paesi nei quali è consentito l'uso di composti diversi (USA-Europa vs Australia per resistenza ai fluorochinolici in (*Campylobacter)*
e. sub-tipizzazioni molecolari	• L'uso come promotore della avoparcina, approvato nel 1974 e bandito in Europa nel 1997, è associato all'emergenza di Enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE): è documentata la stretta somiglianza dei ceppi VRE isolati da suini, pollame, soggetti sani ed ospedalizzati. Inoltre sono riconosciute due varianti codificanti per la vancomicina resistenza e veicolate dal transposone Tn 1546: o variante G: solo in ceppi da pollame e dall'uomo o variante T: solo in ceppi da suini e dall'uomo, ma non da soggetti di fede mussulmana. • Negli USA e in Europa, è provata l'associazione tra uso della gentamicina in *food animals* (pollame, tacchini e suini) e resistenza negli enterococchi isolati dall'uomo. • in Taiwan è documentata - anche con sequenziamento - la correlazione tra stipiti di S. Choleraesuis di origine umana e suina resistenti ai fluochinolinici.

^ *Sono i numerosi gli esempi di casi riguardanti allevatori, loro familiari, ecc. che sono risultati esposti all'infezione con ceppi resistenti attraverso il consumo d'alimenti d'origine animale.*

Tabella 6: Effetti competitivi e selettivi dell'esposizione agli antimicrobici sul rischio di infezione (9)

suscettibilità del patogeno agli antimicrobici	rischio di infezione in caso di trattamento con l'antibiotico	
	prima dell'esposizione al patogeno	**durante** l'esposizione al patogeno
sensibile	**incremento della vulnerabilità** all'infezione da parte del patogeno (effetto competitivo)	**infezione prevenuta**
resistente	**incremento della vulnerabilità** all'infezione da parte del patogeno (effetto competitivo)	**infezione facilitata** (effetto selettivo)

Tabella 7. Studi che documentano un incremento della durata della diarrea in pazienti con infezione da *stipite di Campylobacter* resistente ai chinolonici e trattati con fluoro-chinolonici (Molbak 2004).

	Resistenti		Sensibili		
Referenza	**Numero di pazienti**	**Durata della diarrea (giorni)**	**Numero di pazienti**	**Durata della diarrea (giorni)**	**p-value**
Smith et al.(1999)	69	10	115	7	0.03
McVlellan et al.(2002)[a]	17	8	111	6	0.08
Neimann et al.(2004)	5	14	31	9	0.13
Enberg et a l.(2004) [b]	86	13	381	10	0.001

[a] Differenza anche nei pazienti non trattati

[b] Questa differenza è stata osservata per tutti i pazienti indipendentemente dalla gestione o viaggi all'estero

Tabella 8. analisi multivariata dei pazienti con infezione sistemica da *Salmonella*: frequenza di isolamento di *Salmonella* da emocoltura (dati NARMS n = 7370) e ospedalizzazione pazienti rilevati da Food-Net tra quelli presenti in NARMS (n = 1415) (36)

Pattern di antibiotico- resistenza	**OR (95%CI)**	
	Infezioni ematogenea, analisi NARMS	**Ricoveri con infezioni ematogne[b], analisi FoodNet/NARMS**
Pansuscettibili	riferimento	riferimento
>=1 agente	1.2 (1.0-2.1)	1.7 (0.9-3.1)
Importanti clinicamente	1.6 (1.2-2.1)	3.1(1.4-6.6)
R-type CSSuT	2.1.(1.3-3.3)	4.6 (1.3-16.7)

Note: CI, intervallo di confidenza; OR odds ratio

[a] paragonato a infezione intestinale

[b] paragonato con non ricoverato

[c] resistente ad almeno ampicillia, ceftriazone, ciprofloxacina, gentamicina o trimethoprim-sulfametazolo

[d] resistente almeno a ampicicllina, cloranfenicolo, streptomicina, sulfametazolo e tetraciclina

Tabella 9. Antibiotico-resistenza in stipiti di Salmonella : review dei dati della Letteratura; nell'ultima riga sono riportati i risultati del nostro studio italiano (32)

Area geografica	Fonte di isolamento	Sierotipo di *Salmonella* [1]	Prevalenza di stipiti resistenti [2]	Resistenze o spettri di resistenza più frequenti	Reference
England and Wales	animali ambiente foraggio	Tm (28.053) Dublin (6.548) Other (74.524)	Tm: 42,6-92,4% Dublin: 0,3-1,8% Other: 11,8-45,5% 3	Tm : Am, Te, S, Su	Jones(2002)
Spain	animali	Tm (104) Other (370)	61,7% 81,5%	Am, S, Te Su, Te	Usera(2002)
USA	alimenti importati	Weltevreden (24) Other (163)	tutti i sierotipi: 8%	Te (4,3%)	Zhao (2003)
Europe	animali	Tm (108) Other (163)	4	Am (16,1-54,7%) Te (34,9-100%) 3	Bywater (2004)
USA	suini	Tm	4	AmKmStSuTe (44,6%) AmCmStSuTe (36,2%)	Gebreyes (2002)
USA	suini	Tm (24) Altri 6 sierotipi (17)	tutti i sierotipi MDR 98%	All the serotypes: Su (95%); Te (88%) Tm DT104: AmCSSuTe (100%)	White (2003)
USA	alimenti importati	Weltevreden (41) Other (167)	tutti i sierotipi: 11%	Te (9%)	Zhao (2006)
UK	uomo animali	35 sierotipi (397)	tutti i sierotipi: 45%	Am (22,9%) C (21,4%)	Randall (2004)
France	uomo	Tm (320)	78,5%	Te (71%); Su (68%); Amx (64,7%); S (64,5%); Sp (59%); C (59%); AmSSpSuCTe (48,8%)	Weill (2006)
Ireland	uomo, alimenti, animali	Tm (67)	88% poli-resistenti	ACSSuT (77,6%)	Gorman (2004)
Holland	uomo, animali	≥25 sierotipi (237) 5	tutti i sierotipi: 46% resistenti; 29%poli-resistenti	Su (29%); Am (21%); Te and S (17%)	Vo Antt (2006)
Portugal	uomo, alimenti, ambiente	Tutti I sieriotipi (1183)	Na; Te; S; Su; Am: 17-31%	nessuno	Antunes (2006)
Italy[6]	uomo, animali	Tm	4	AmCSSpSuT (75,9%)	Carattoli (2002)
Italy (Lombardia)	animali	21sierotipi (113) Tm e variante (54)	tutti i sierotipi: 85,0% (MDR 76,1%) Tm e variante monofasica: 100% (MDR 94,7%)	AmSSuTe (19,7%)	Nostro studio

0. Tm: abbreviazione per S. Typhimurium
1. tra parentesi il numerodi ceppi , se indicato
2. la prevalenza di stipiti resistenti (mono- and poli-resistenti) è riferita a tutti I sierotipi analizzati o, quando possibile, ai sierotipi maggiori, The observed range in the period 1988-1999 is indicated: for S. Typhimurium the minimum value in 1992 and maximum in 1995; for S. Dublin the minimum value in 1990 and 1996, and the maximum in 1997; for other serotypes the minimum value in 1988 and maximum in 1995
3. l'incidenza complessiva e/o la prevalenza per sierotipo non è riportata dall'European review (Bywater) la prevalenza è associate al tipo di of animale e al Paese (per Am il valore massimo in Francia e minimo in Olanda; per Tentassimo valore in Sapgna e minimo nel Regno Unito)
4. il totale dei sierotipi non è calcolabile ; gli Autori riportano che gli stipiti resistenti appartenevano a 25 sierotipi
5. gli stipti sono stati selezionati partendo dalla collezione dell'Istituto Superiore di Sanità -Roma" e dell "Istituto Zooprofilattico Sperimentale- Padova"

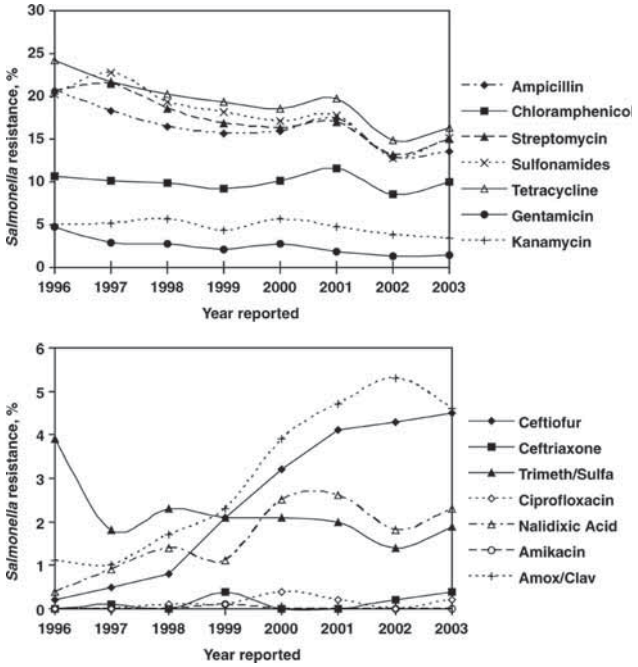


Figura 1. *Trends 1996-2005 dell'antibioticoresistenza in stipiti di Salmonella isolati da fonti veterinarie (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) (18)*

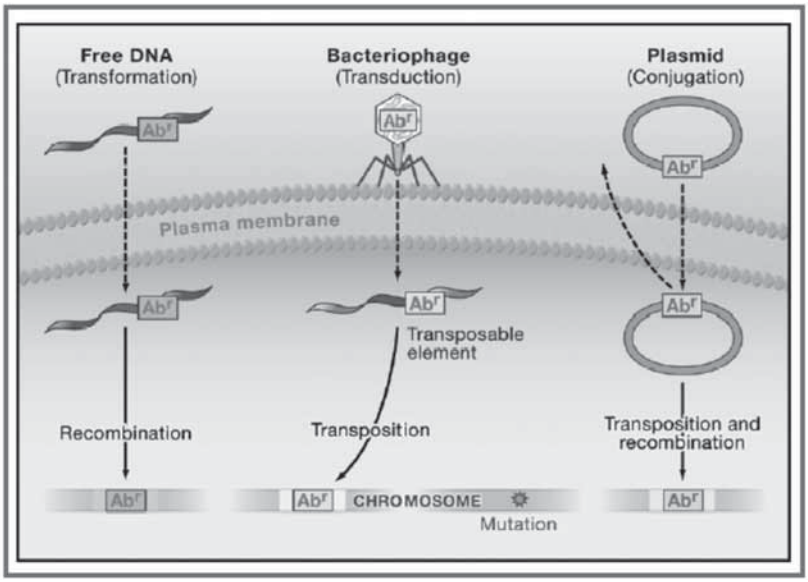


Figura 2a. *I tre principali meccanismi di trasferimento orizzontale dei caratteri di resistenza (3).*

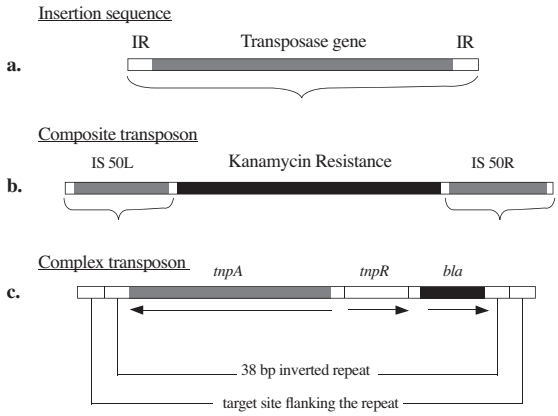
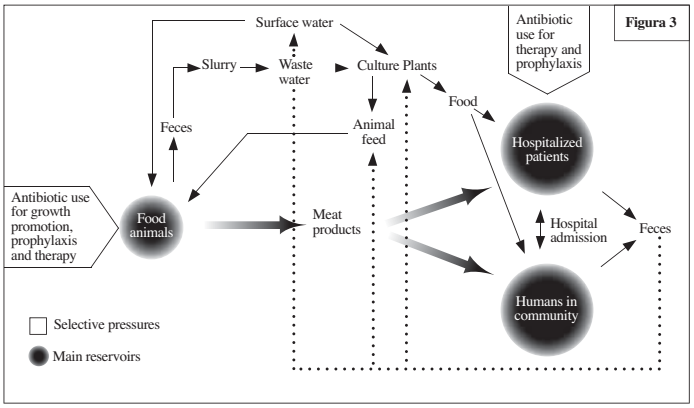


Figura 2b. *Illustrazione schematica delle sequenze di inserzione (a), di un transposone composto (b) di un transposone complesso(c) (27)*



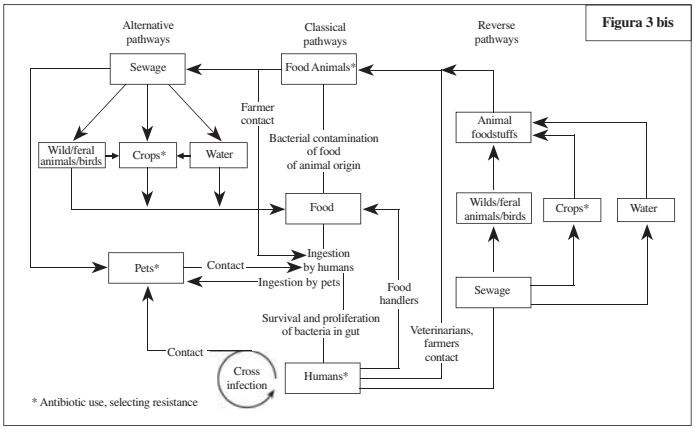


Figura 3 e 3 bis*. passaggio delle resistenze dagli animali all'uomo: da Witte W, 1998 (figura3) e da Phillips, I. et al. 2004 (Figura 3 bis) (31,41)*

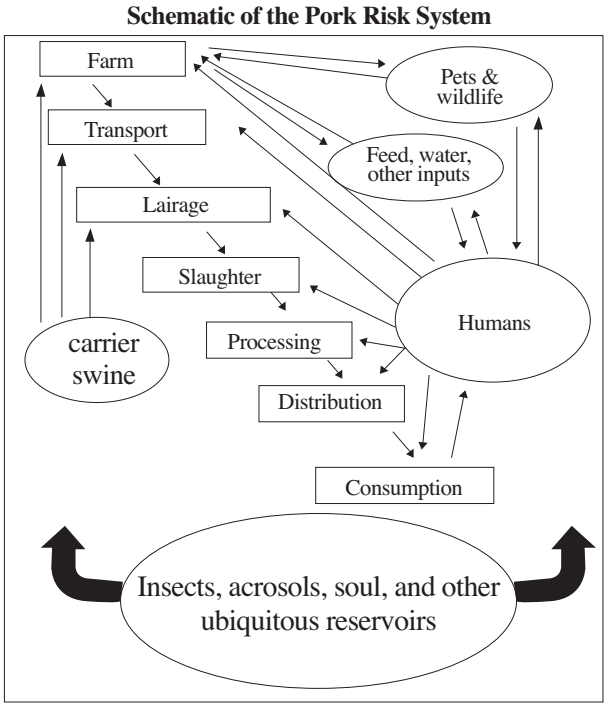


Figura 4. *salmonellosi: sistema di rischio (7)*

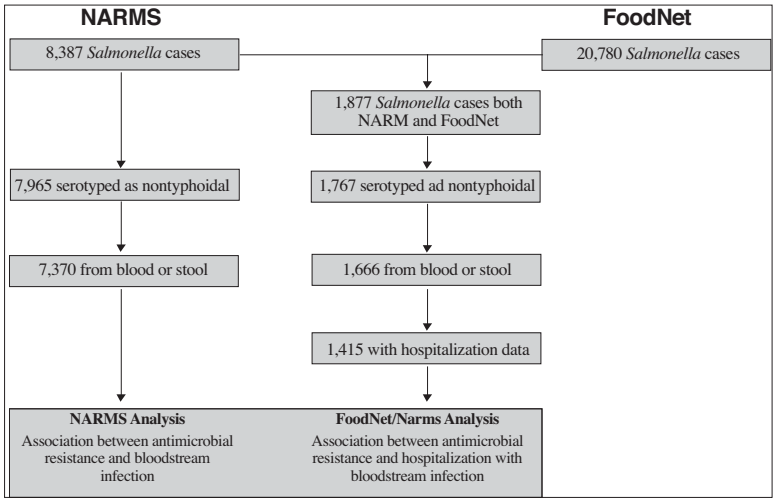


Figura 5. *Pazienti con infezione da Salmonella confermata mediante esame colturale e inclusi nell'analisi dei dati a cura del National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) e del Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2001 (36).*

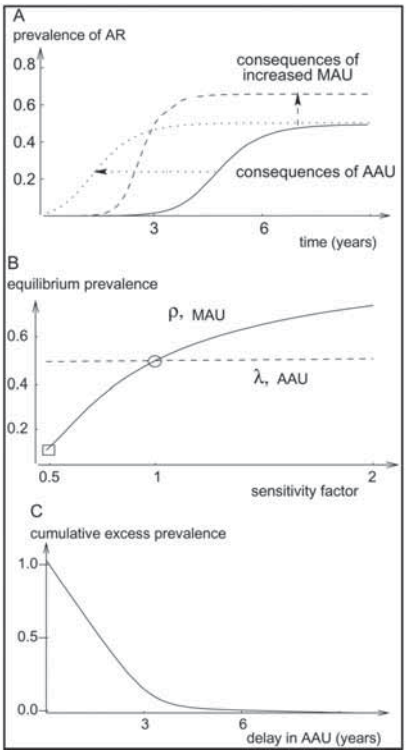


Figura 6. *il modello matematico di Smith et al. (33) (AAU = Animal Antibiotic Use MAU = Medical Antibiotic Use)*

Figura 7. *la complessità dei fattori in gioco in tema di antibiotico- resistenze (24, modificata)*

USO RAZIONALE DEGLI ANTIBIOTICI E ANTIBIOTICO RESISTENZA

DAVID G S BURCH
Octagon Services Ltd, Old Windsor, Berkshire, UK

Parole chiave: Antibiotici, Resistenza, Suini

Sommario: Ogni qual volta si usano degli antimicrobici, c'è sempre il rischio di selezione della resistenza antimicrobica. Alcune specie di batteri sembrano sviluppare tale resistenza più velocemente di altre, ad empio *Escherichia Coli* e per alcuni antimic robici, ad es. le tetracicline, lo sviluppo della resistenza avviene in modo molto semplice. Il primo approccio adottato è ridurre o evitare l'uso di antimicrobici impiegando animali in ottima salute (esenti da germi patogeni specifici o "SPF"), utilizzando programmi di eradicazione di patologie o vaccinazioni ovunque possibile, e utilizzando inoltre strategie per ridurre il rischio infettivo. Quando si è costretti ad utilizzare antimicrobici, è opportuno seguire programmi di impiego ottimali per ridurre il rischio di sviluppo di resistenza. Assicuratevi di applicare la terapia all'organismo giusto, utilizzando culture e test di suscettibilità antimicrobica e anche impiegando le giuste conoscenze in merito alle concentrazioni di farmaco necessarie ad uccidere l'organismo nei tessuti o fluidi da esso infestati. Comprendere la farmacocinetica degli antimicrobici è fondamentale così come mettere in relazione tali dati con gli effetti farmacodinamici sui batteri per ottenere non solo una cura clinica ma anche una batterica. Andare oltre la finestra di selezione dei mutanti aiuta inoltre a migliorare gli effetti clinici a lungo termine di un antimicrobico e riduce lo sviluppo della resistenza. Il presente articolo esamina le strategie che aiutano a ridurre lo sviluppo della resistenza nella produzione dei suini utilizzando l'integrazione e l'applicazione farmacocinetica/farmacodinamica.

INTRODUZIONE

Ogni qual volta si usano degli antimicrobici, c'è sempre il rischio che si verifichi la selezione della resistenza antimicrobica. Nel Regno Unito, recenti statistiche (VMD, 2008) mostrano che nel 2007 sono state usate 387 tonnellate di farmaci antimicrobici, sia per animali da allevamento che da compagnia. L'ottantanove per cento di tale quantità è stato somministrato per via orale, principalmente insieme a mangimi premix o come medicine disciolte nell'acqua potabile e solo il 10% per iniezione. Le tetracicline sono l'antibiotico usato più di frequente (45%) seguite da combinazioni di trimetoprim/sulfonamidi (19%) e dagli antibiotici beta-lattami (penicilline, penicilline sintetiche etc.) al 17%. Le cefalosforine e i fluoroquinoloni, considerati di importanza fondamentale nella medicina umana sono usati rispettivamente nel 1,6% e 0,5% dei casi negli animali, una percentuale molto bassa. Si stima che l'uso di antimicrobici nei suini copra il 53% dell'uso complessivo di tali farmaci, nonostante il fatto che nel Regno Unito vengano macellati solo 9 milioni di suini l'anno. Ne consegue che il veterinario dei suini è responsabile dell'uso ac-

corto e giudizioso dei farmaci antimicrobici per ottenere i migliori risultati a livello clinico, batteriologico ed economico per i suoi clienti, per provare a limitare lo sviluppo della resistenza antimicrobica nella popolazione suina ma anche per ridurre le possibilità di diffusione della resistenza nella popolazione umana.
Il presente articolo esamina lo stato della conoscenza della farmacocinetica (PK) nei suini, e le informazioni di farmacodinamica (PD) che possono essere sviluppate nei laboratori clinici e universitari, nonché il modo in cui i due possano essere integrati così che uso, dosaggio e via di somministrazione degli antibiotici e le possibilità di evitare lo sviluppo di resistenza possano essere incluse nei processi decisionali relativi all'uso antimicrobico.

RELAZIONI DI BASE TRA PK E PD

a. Aspetti farmacocinetici

La comprensione di base della farmacocinetica dei prodotti medici è fondamentale per comprendere il modo in cui gli stessi funzionano nel maiale (Fig. 1)

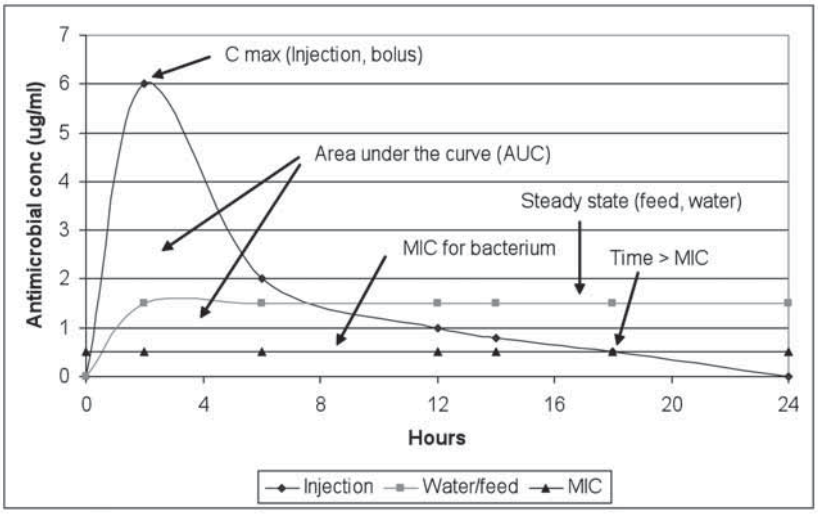


Fig. 1. Confronto tra la farmacocinetica di base di un antibiotico somministrato per iniezione, o per via orale nel mangime o nell'acqua

La concentrazione massima (Cmax) è la concentrazione plasmatica più alta riscontrata dopo la somministrazione. Generalmente, in caso di somministrazione per iniezione si ha un picco molto alto che poi scende gradualmente. Il tempo necessario per raggiungere il picco di concentrazione è detto Tmax. Per i farmaci somministrati per via orale i picchi sono in genere molto più bassi e Tmax è più lungo ma in caso di alimentazione ad libitum, i livelli di plasma possono rimanere decisamente stabili durante il giorno.

È inoltre possibile misurare le curve di concentrazione e anche l'area sotto la curva nel periodo di 24 ore (ASC 24h) è una misurazione piuttosto utile. Il declino della curva, se confrontato con la concentrazione minima inibitoria (MIC) inoltre indica il periodo di tempo in cui la curva si trova sopra alla MIC (T>MIC), che è particolarmente utile per la determinazione dell'intervallo di dosaggio, vale a dire se un farmaco deve essere somministrato una, due o più volte al giorno etc.
Il rapporto Cmax/MIC è importante per alcuni farmaci antimicrobici quali aminoglicosidi (apramicina, gentamicina, ecc.) e anche fluoroquinoloni (enrofloxacina, marbofloxacina ecc.) in quanto è stato mostrato (Schentag, 2000) che quando il rapporto Cmax/MIC è di circa 10-12 è perché l'uccisione del batterio ha avuto successo e i risultati clinici nei pazienti immunocompromessi negli ospedali sono migliori. La MIC è simile alla concentrazione battericida minima (MBC) per questi farmaci antimicrobici e il rapporto MBC/MIC = 1-2: 1. Essi inoltre mostrano un buon effetto post-antibiotico (EPA) vale a dire che il batterio non ha ripreso a crescere per qualche tempo dopo la rimozione dell'antibiotico. La Colistina, una polimixina, rientra in questa categoria.

L'ASC 24h è anche un parametro PK utile per i farmaci battericidi, in quanto prevede una componente di tempo e concentrazione, specialmente per i farmaci iniettabili in presenza di una fluttuazione di concentrazione. Un rapporto ASC 24h/MIC di 100-120 fornisce una previsione utile della uccisione batterica effettuata dai farmaci antimicrobici battericidi quali aminoglicosidi e fluoroquinoloni, combinazioni trimetroprim/sulfonamidi e beta-lattami (penicilline e cefalosporine), anch'essi parte di questo rapporto. La componente Tempo >MIC viene spesso considerata maggiormente importante per gli antibiotici beta-lattami (Lees et al, 2008) anche se è presente anche un aumento del tasso di abbattimento a concentrazioni più elevate. Gli antibiotici tempo- e concentrazione-dipendenti sono detti co-dipendenti e molti antibiotici usati nella cura dei suini hanno questo tipo di rapporto (Fig 2).

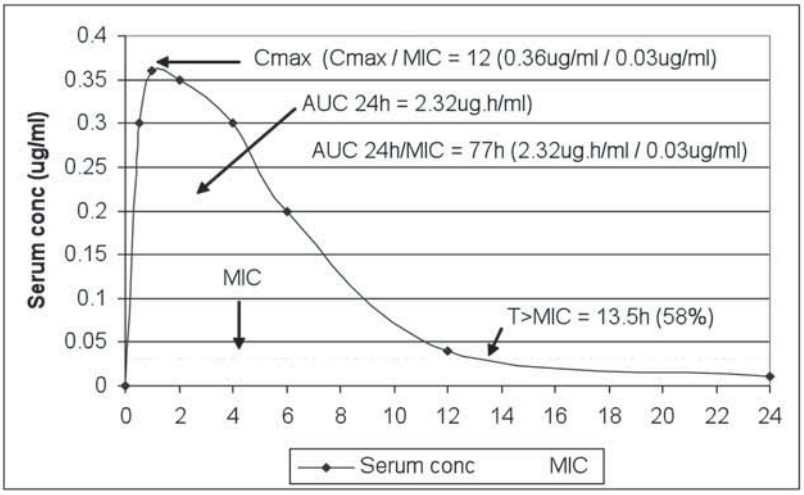


Fig. 2. esempio di rapporto di integrazione PK/PD per l'enrofloxacina e la *Pasteurella multocida* (MIC 0,03µg/ml) (Lees & Aliabadi, 2002)

Se il rapporto ASC 24h/MIC viene suddiviso nelle 24 ore risulta circa 4-5 volte superiore rispetto alla MIC e rappresenta un altro rapporto utile per concentrazioni antimicrobiche riscontrate nel contenuto del plasma o delle viscere dopo la somministrazione per via orale. Queste concentrazioni sono concentrazioni allo stato quasi stazionario (SS) e sono pertanto utili per i riferimenti incrociati a concentrazioni in singoli time-point come quelle nei polmoni. Per quanto riguarda gli antibiotici batteriostatici quali tetracicline, macrolidi, lincosamidi e pleuromutilini, il rapporto ASC 24h/MIC fornisce un punto di riferimento per l'inibizione o per un effetto batteriostatico, ad esempio ASC 24h/MIC = 24h. Tuttavia, per ottenere un effetto battericida, l'ASC 24h deve essere diviso per il MBC in modo che possa essere molto diverso da MIC ad es. rapporto MBC/MIC = 2-40: N° 1).

b. Aspetti farmacodinamici - test di suscettibilità antimicrobica

Ci sono diversi metodi per determinare la suscettibilità di un organismo ad un antibiotico. Il Clinical and Laboratories Standards Institute (CLSI – precedentemente noto come NCCLS) è intento a stabilire procedure fisse e riproducibili da diversi laboratori in tutto il mondo, nonché ad unificare gli standard. Molti laboratori utilizzano i propri metodi di coltura e valutazione della suscettibilità per i batteri, mezzi che possono dare risultati diversi; per questo motivo è in corso di sviluppo un approccio standardizzato, anche se il processo è continuativo e non ancora finalizzato per tutti i batteri veterinari e i farmaci antimicrobici veterinari.

Uno dei metodi più comunemente utilizzati nei laboratori di clinica veterinaria è il metodo Kirby-Bauer con dischetti di sensibilità contenenti un preparato antibiotico di forza nota, che vengono posizionati su piastre da coltura in cui l'organismo sta crescendo. La sensibilità viene giudicata esaminando visivamente le dimensioni della zona di inibizione che indicano, approssimativamente, se il prodotto è sensibile, mediamente resistente o totalmente resistente. Ad ogni modo, una tecnica relativamente semplice di misurazione della zona può anche fornire un maggior quantitativo di informazioni sulla MIC dell'organismo mettendolo n relazione con degli appositi grafici e confrontando le dimensioni delle zone con la MIC (Fig. 3). Quanto sopra fa parte anche del lavoro svolto dal CLSI.

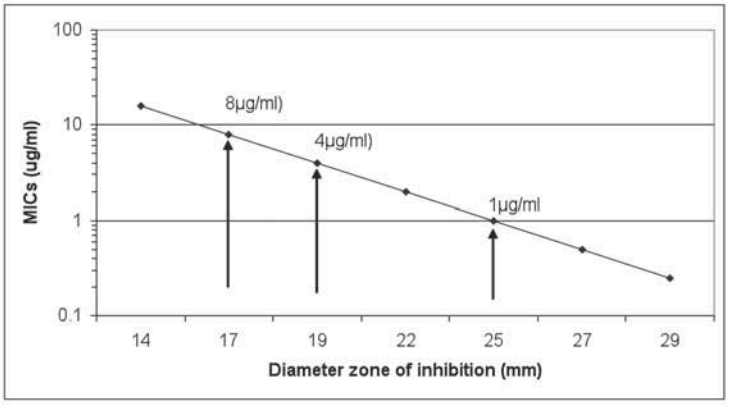


Fig. 3. Diametro della zona di inibizione e MIC per tiamulina e *A. pleuropneumoniae (Casals et al, 1990)*

Le concentrazioni inibitorie minime vengono calcolate in genere utilizzando diluizioni a raddoppio di antibiotici per determinare la concentrazione che inibisce la crescita dell'organismo. Ciò può essere effettuato in provette con brodo di coltura, microprovette su piastre e piastre di agar contenenti l'antibiotico. Possono verificarsi variazioni e imprecisioni, ad esempio raddoppiare la diluizione significa produrre una variazione del 50% tra diluizioni distinte. Questo problema può essere superato utilizzando diluizioni sovrapposte ma ciò non viene sempre fatto. Più di recente, sono state messe in evidenza ulteriori limitazioni delle tecniche standard di coltura utilizzate, che non sempre rappresentano fedelmente la crescita dell'organismo nel plasma o in analoghi fluidi corporei extracellulari perché altri fattori, quali le proteine, possono svolgere un ruolo. Questo è uno dei punti deboli del sistema CLSI per alcuni dei patogeni dell'apparato respiratorio quali A. *pleuropneumoniae*, venuti alla luce di recente, che rende impossibile effettuare integrazioni PK/PD affidabili per alcuni antibiotici quali tulatromicina, tilmicosina e tiamulina, in cui la MIC supera notevolmente la concentrazione del plasma.

c. Pattern di suscettibilità e breakpoint

Quando le MIC di un antibiotico per una data specie batterica sono state stabilite, vengono in genere indicate MIC 50, MIC 90 e Range. MIC 50 e MIC 90 sono le concentrazioni di antibiotico che inibiscono rispettivamente il 50% e il 90% delle colture isolate, mentre il range indica le concentrazioni minima e massima. Tali parametri sono utili per avere un'idea generica della suscettibilità ad un antibiotico ma devono essere inquadrate nel contesto relativo alla concentrazione antimicrobica ottenibile nel plasma o nei contenuti delle viscere, ad esempio, per determinare quali siano i breakpoint clinici di un dato batterio e dell'antibiotico.

Bywater et al (2006) descrive il nuovo concetto di Valore di Soglia (Cut-Off) Epidemiologica (ECOV) o breakpoint "selvatico" per popolazioni batteriche non esposte ad antibiotici e lo confronta con il breakpoint clinico raggiungibile con i farmaci e inoltre con il breakpoint microbiologico, breakpoint che può essere diverso e addirittura più alto (Fig. 4). Nello studio sono stati usati ciproflaxina ed *E. coli* come esempio.

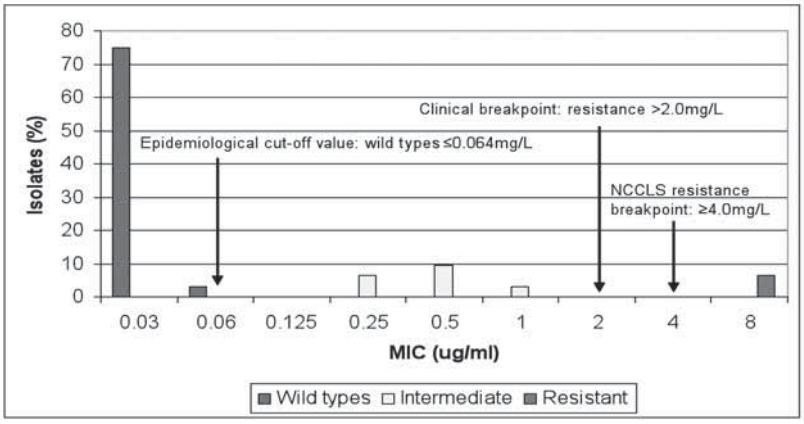


Fig. 4. Nuovi concetti – determinazione dei diversi breakpoint (Bywater et al, 2006)

È presente un primo cluster distinto di isolati, che rappresenta i ceppi selvatici. Il secondo cluster rappresenta il primo stadio mutante, resistente all'acido nalidissico ma suscettibile ad elevati livelli di ciprofloxacina e il terzo cluster viene considerato realmente resistente solo dopo la seconda mutazione.

Per alcuni antibiotici la resistenza si sviluppa in un'unica soluzione (come l'acido nalidissico) e quindi il pattern di suscettibilità può indicare come si sviluppa la resistenza e anche, in modo più preciso e più agevolmente rispetto alla MIC50 o MIC90, la percentuale di isolati che rimane sensibile o ha sviluppato la resistenza.

Le mutazioni nei batteri si verificano spontaneamente alla velocità di 10^{6} - 10^{10} per generazione di geni. Drlica (2003) ha descritto il concetto di utilizzo degli antibiotici a concentrazioni superiori dopo il primo stadio di mutazione, in modo da uccidere sia i "selvatici" che i mutanti di primo stadio, ritenendo il verificarsi di una doppia mutazione un evento improbabile. I concetti di finestra di selezione dei mutanti e concentrazione di prevenzione delle mutazioni (MPC) sembrano offrire un approccio efficace alla riduzione dello sviluppo della resistenza per alcuni antibiotici (Fig. 5).

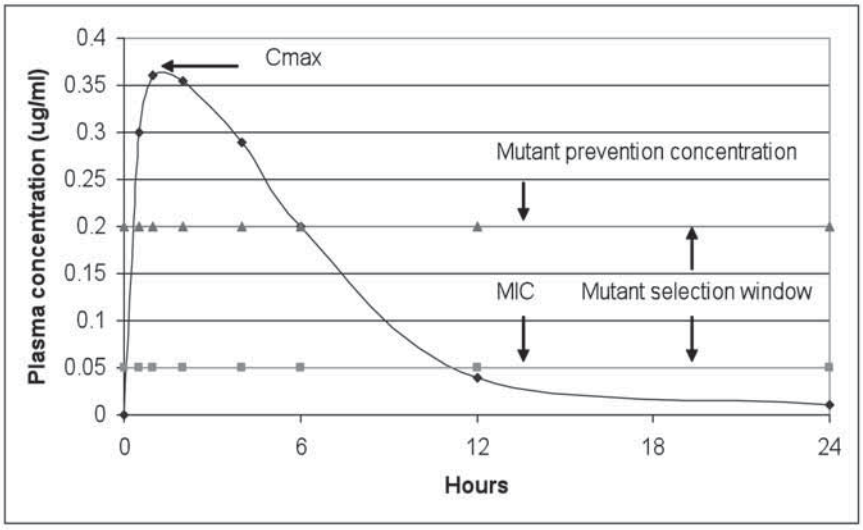


Fig. 5. Diagramma della finestra di selezione dei mutanti e della concentrazione di prevenzione delle mutazioni in rapporto alla MIC

Un esempio di questo fenomeno in veterinaria è l'enroflaxicina usata per le infezioni di *E. coli* nei suinetti. Wiuff et al (2002) hanno misurato le concentrazioni di enrofloxacina nel plasma e nel contenuto delle viscere dopo la somministrazione per via orale ai suinetti al dosaggio di 2,5 mg/kg di peso corporeo. Quando questo dato viene confrontato con i pattern di suscettibilità alla MIC dell'*E. coli*, è possibile rilevare le concentrazioni nel segmento digiuno che uccidono non solo i ceppi selvatici ma anche i mutanti di primo stadio (Fig. 6).

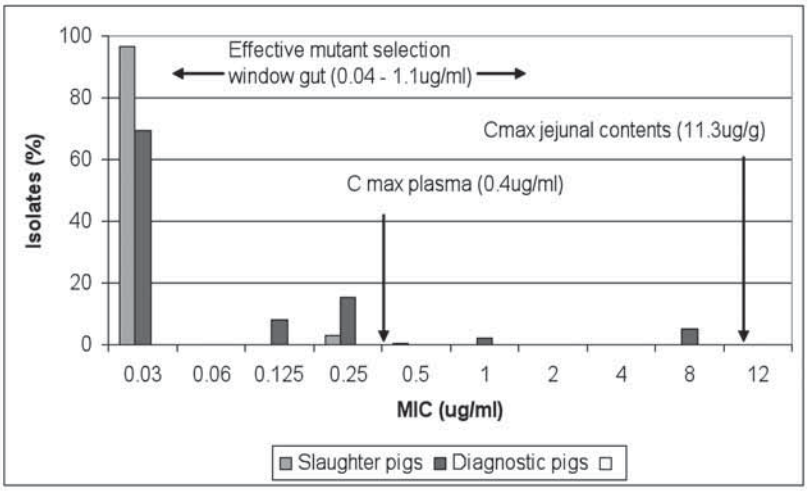


Fig. 6. Finestra di selezione dei mutanti nel contenuto del digiuno dopo la somministrazione orale dell'enrofloxacina usata contro l'*E. coli* nei suini

Tanto maggiore la concentrazione è superiore all'MPC tanto minore è la probabilità che la crescita di un mutante nella popolaz ione sia eccessiva in quanto lo stesso viene inibito o distrutto. L'arricchimento in mutanti avviene al di sopra della MIC, vale a dire nella finestra di selezione dei mutanti, ma non al di sotto della MIC.

La concentrazione di tiamulina nel colon, quando il preparato viene usato ad alti livelli per la cura della dissenteria suina (Anderson et al, 1994), è in grado di superare anche le concentrazioni di prima mutazione di *brachyspira hyodysenteriae* (Fig. 7).

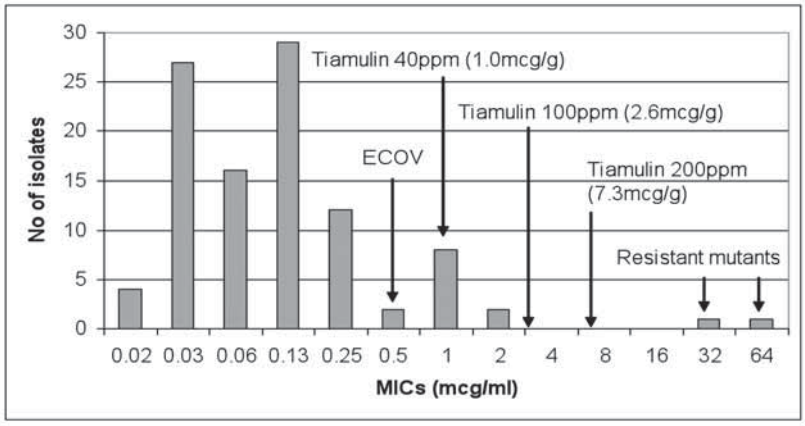


Fig. 7. Concentrazione di tiamulina nel contenuto del cieco in rapporto al pattern di suscettibilità della MIC quando il farmaco è utilizzato contro il *B. hyodysenteriae*.

La capacità della tiamulina di uccidere i batteri suscettibili e i mutanti di primo stadio può essere una spiegazione del perché il farmaco abbia mantenuto molta della sua attività contro il *B. hyodysenteriae* nel corso degli ultimi 30 anni.

Qualora non sia possibile mantenere le concentrazioni antimicrobiche al di sopra della MPC, un altro approccio usato nella medicina non veterinaria è utilizzare combinazioni di farmaci che agiscono sull'organismo in modi differenti. È da considerarsi improbabile che l'organismo sotto terapia sviluppi resistenza a due diversi antibiotici allo stesso momento. L'uso di penicilline e aminoglicosidi è piuttosto comune, si pensi a penicillina e streptomicina spesso utilizzati in veterinaria, a piperacillina e gentamicina per infezioni di Pseudomonadi negli umani e, di recente, meropenem e tobramicina (Tam et al, 2005).

d. Approccio terapeutico e rischio di sviluppo del mutante

Tali concetti possono essere utilizzati per confrontare gli approcci terapeutici e il relativo rischio di sviluppo mutante (Tabella 1).

Tabella 1. Approccio terapeutico e confronto tra i rischi di sviluppo del mutante

Approccio	Quantità di batteri	Finestra di selezione dei mutanti	Rischio di mutazione
Livello di prevenzione (basso dosaggio)	Bassa $<10^6$	Nel (frequente uso prolungato)	Media
Metafilassi (alto dosaggio)	Bassa $<10^6$	In Sopra	Bassa Molto bassa
Trattamento (alto dosaggio)	Alta $>10^6$	In Sopra	Alta Media
Combinazione	Alta $>10^6$	In Sopra	Bassa (doppia mutazione) Molto bassa

e. Incongruenze con l'integrazione PK/PD

In alcuni casi è stato difficile ricorrere all'integrazione PK/PD per valutare l'efficacia di alcuni farmaci antimicrobici, in particolare quelli per batteri dell'apparato respiratorio. Quando l'enrofloxacina venne introdotta per la prima volta, la MIC per gli isolati di *M. hyopneumoniae, P. multocida, A. pleuropneumoniae e H. parasuis* era ≤0,025µg/ml (Hannan et al, 1989). La PK nel Plasma (Scheer, 1987) e l'integrazione con la PD rientrano nei criteri descritti in precedenza (Fig. 8 & 9) e anche se l'enrofloxacina si concentra effettivamente nel tessuto polmonare in una certa misura, la concentrazione nel plasma sembra essere comunque il parametro più critico per gli aspetti relativi alla PK.

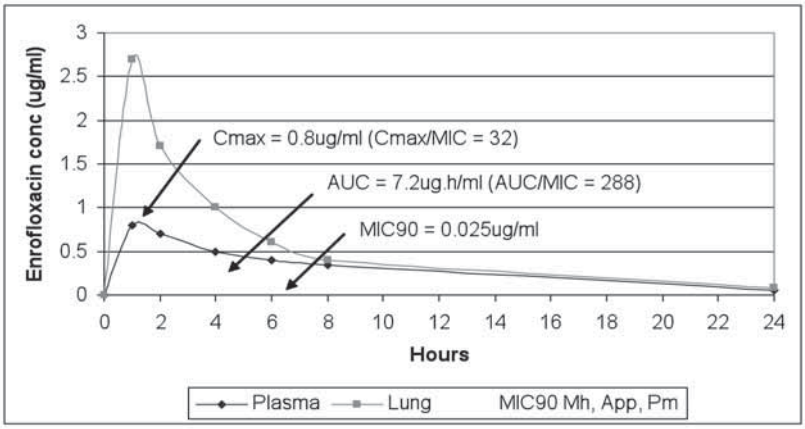


Fig. 8. Curve di PK nel plasma e nei polmoni per enroflaxicina e integrazione PK/PD per gli organismi respiratori

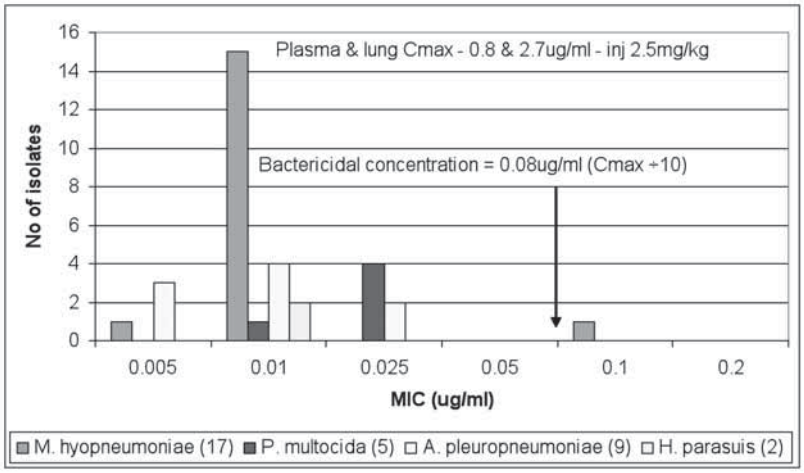


Fig. 9. Rapporto della Cmax dell'Enrofloxacina con la MIC per i patogeni delle vie respiratorie

La maggioranza dei patogeni delle vie respiratorie può essere eliminata efficacemente con un'iniezione di dosaggio 2,5 mg/kg peso corporeo, in quanto la Cmax / 10 è 0,08 µg/ml, ben superiore alla MIC di 0,025 µg/ml.

Con la tulatromicina il quadro che si ottiene è differente. Benchaoui et al, 2004 descrive la PK della tulatromicina nei suini dopo una iniezione con dosaggio di 2,5 mg/kg. Il profilo della PK è significativamente differente da quello dell'enrofloxacina per quanto riguarda la durata delle attività (giorni) e la relativa concentrazione nel plasma e nel tessuto polmonare (Fig. 10).

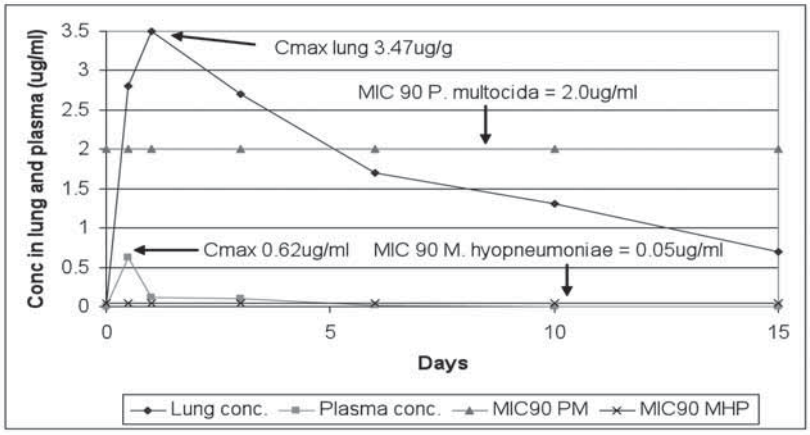


Fig 10. Curve di PK nel plasma e nei polmoni per tulatromicina e MIC 90 per *M. hyopneumoniae e P. multocida*

C'è una sostanziale differenza nei MIC 90 di *M. hyopneumoniae e P. multocida*. Quando gli altri batteri delle vie respiratorie sono stati esaminati c'erano differenze ancora più significative, specialmente per l'*A. pleuropneumoniae* (Godinho, 2008; Godinho et al, 2005), contro cui il farmaco è attivo in vivo (Fig. 11).

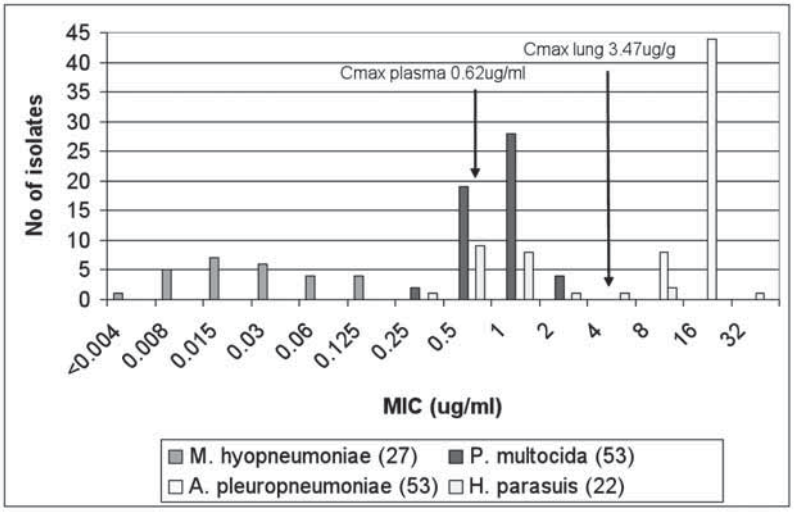


Fig. 11. Confronto tra i MIC per la tulatromicina utilizzata contro diversi patogeni delle vie respiratorie

Quando i batteri vengono testati con i test standard CLSI per gli organismi respiratori, si ottengono livelli di MIC molto alti. In queste circostanze si è fortemente tentati di osservare altri parametri PK, come concentrazione nei polmoni e concentrazione dei ma-

crofagi per tali antibiotici. Tali parametri sono stati descritti per la tilmicosina (Stoker et al, 1996) e anche per la tiamulina (Burch & Klein, 2008) per spiegare l'integrazione PK/PD. Tuttavia, quando vengono utilizzati metodi non-CSLI che incorporino un quantitativo di siero nel mezzo usato per la cultura molto più basso, si ottengono probabilmente MIC maggiormente rappresentative (Fig. 12).

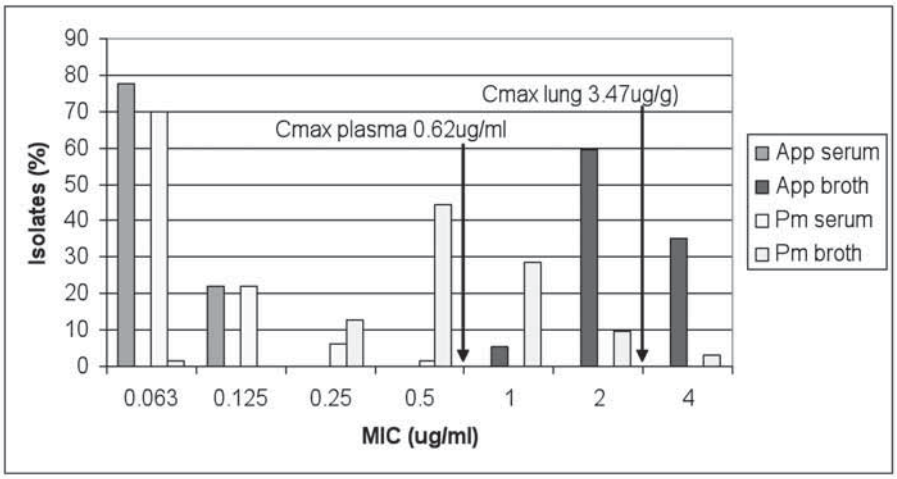


Fig. 12. Confronto tra MIC della tulatromicina contro se sviluppati nel brodo o in un mezzo contenente siero

La suscettibilità del batteri alla tulatromicina è stata aumentata di 3-5 diluizioni, portando la MIC degli organismi nell'intervallo di PK del plasma analogo a molti altri antibiotici.

CONCLUSIONI

L'integrazione di PK/PD può essere molto utile per scegliere le migliori medicine e impiegarle correttamente per ottenere il migliore programma possibile. È un dato molto potente per l'interpretazione dei dati perché se i dati non corrispondono, in genere è perché alcuni aspetti non sono gestiti correttamente, ad es. il metodo MIC è sbagliato, o la concentrazione del tessuto oggetto è sbagliata probabilmente a causa dell'elevata legatura delle proteine. Le relazioni PK/PD individuate nel trattamento dei soggetti umani sono molto utili per le terapie veterinarie, anche se è necessario includere alcuni aspetti aggiuntivi. La medicina veterinaria spesso usa farmaci più vecchi come le tetracicline, che sono principalmente batteriostatiche. Il rapporto della PK con i pattern di resistenza antimicrobica è inoltre utile per determinare gli effetti della passata esposizione e dello sviluppo della resistenza. I nuovi sviluppi sui breakpoint epidemiologici, i pattern di mutazione e i breakpoint clinici sono inoltre utili al medico per migliorare i programmi di dosaggio e, ove possibile, superare la concentrazione di prevenzione della mutazione, così che le possibilità di selezione

dei mutanti e sviluppo della resistenza vengono ridotte.
Nella medicina veterinaria ci sono altri limiti da prendere in considerazione, quali il costo economico delle medicine, la potenziale tossicità causata dall'aumento delle dosi e la riduzione della palatabilità nel caso di somministrazione orale, nonché gli effetti dell'astinenza. Tuttavia, ci sono altre opportunità, concesse dalle tecniche di integrazione PK/ PD, per migliorare la nostra comprensione del funzionamento degli antibiotici ed aiutare i veterinari ad usarli in modo prudente e più efficace per ridurre lo sviluppo della resistenza sia negli animali che negli uomini.

RIFERIMENTI

Anderson, M.D., Stroh, S.L. and Rogers, S. (1994) Tiamulin (Denagard®) activity in certain swine tissues following oral and intramuscular administration (*Attività della tiamulina (Denagard®) in alcuni tessuti dei suini dopo la somministrazione orale e intramuscolare*). Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, Chicago Illinois, USA, pp115-118

Benchaoui, H.A., Nowakowski, M., Sherington, J., Rowan, T.G. and Sunderland, S.J. (2004) Pharmacokinetics and lung concentrations of tulathromycin in swine. (*Farmacocinetica e concentrazione polmonare della tulatromicina nel suino.*) Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 27, 203-210

Burch, D.G.S. and Klein, U. (2008) Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of tiamulin (Denagard ®) for respiratory infections in pigs (Rapporti farmacocinetici/farmacodinamici della tiamulina (Denagard ®) per le infezioni respiratorie nei suini). Atti del XX Congresso IPVS, Durban, S. Africa, 2, p. 494.

Bywater, R., Silley, P. and Simjee, S. (2006) Letter: Antimicrobial breakpoints – definitions and conflicting requirements (*Lettera su: breakpoint antimicrobici, definizioni e requisiti in conflitto*). Veterinary Microbiology, 118, 158-159.

Casals, J.B., Nielsen, R. and Szancer, J. (1990) Standardisation of tiamulin for routine sensitivity of Actinobacillus (*Haemophilus*) pleuropneumoniae (Ap).
(Standardizzazione della tiamulina per la sensibilità di routine dell'Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae(Ap).)Atti del XI Congresso IPVS, Losanna, Svizzera, p. 43.

Drlica, K. (2003) The mutant selection window and antimicrobial resistance. (*Finestra di selezione dei mutanti e resistenza antimicrobica*)Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52, 11-17

Godinho, K.S., Keane, S.G. Nanjiani, I.A., Benchaoui, H.A., Sunderland, S.J., Jones, M.A., Weatherley, A.J., Gootz, T.D. and Rowan, T.G. (2005) Minimum concentrations of tulathromycin against respiratory bacterial pathogens isolated from clinical cases in European cattle and swine and variability arising from changes in in-vitro methodology. (*Concentrazioni minime di tulatromicina per combattere patogeni delle vie respiratorie isolati da casi clinici di bovini e suini europei e variabilità*

dovute alle metodologie in vitro). Veterinary Therapeutics, 6, 2, 113-121.
Godinho, K.S. (2008) Susceptibility testing of tulathromycin: Interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates (*Test di suscettibilità della tulatromicina. Breakpoint interpretativi e suscettibilità degli isolati sul campo*). Veterinary Microbiology, 129, 426-432.

Hannan, P.C.T., O'Hanlon, P.J. and Rogers, N.H. (1989) In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. (*Valutazione in vitro dei diversi agenti antibatterici quinolonici usati contro micoplasmi veterinari e patogeni batterici delle vie respiratorie dei suini*). Research in Veterinary Science, 46, 202-211.

Lees, P. and Aliabadi, F.S. (2002) Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. (*Dosaggio razionale di farmaci antimicrobici: animali vs. uman*i) International Journal of Antimicrobial Agents, 19, 269-284

Lees, P., Svendsen, O. and Wiuff, C. (2008) Chapter 6: Strategies to minimise the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. (*Capitolo 6: strategie di minimizzazione dell'impatto delle terapie antimicrobiche nella selezione dei batteri resistenti*). In Guide to Antimicrobial Use in Animals. Eds, Guardabassi, L., Jensen, L.B. and Kruse, H., Blackwell Publishing, Oxford, UK pp. 77-101

Scheer, M. (1987) Concentrations of active ingredient in the serum and in tissues after oral and parenteral administration of Baytril. (*Concentrazioni del principio attivo nel siero e nei tessuti dopo la somministrazione per via orale e parenterale del Baytril*). Veterinary Medical Review, 2, 104-118.

Schentag, J.J. (2000) Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. (*Farmacologia clinica dei floroquinoloni: studi su modelli umani dinamici/chinetici)* Clinical Infectious Disease, 31 (Supplement 2) S40-44

Stoker, J., Parker, R. and Spencer, Y. (1996) The concentration of tilmicosin in pig serum and respiratory tissue following oral administration with Pulmotil® via the feed at a level of 400g/tonne. (*La concentrazione della tilmicosina nel siero e nel tessuto respiratorio dei suini dopo la somministrazione per via orale di Pulmotil® nel mangime al dosaggio di 400g/tonnellata*). Atti del XIV Congresso IPVS, Bologna, Italia,, p. 656.

Tam, V.H., Schilling, A.N., Neshat, S., Poole, K., Melnick, D.A. and Coyle, E.A. (2005) Optimization of Meropenem minimum concentration/MIC ratio to suppress in vitro resistance of Pseudomonas aeruginosa. (*Ottimizzazione del rapporto concentrazione minima/MIC del Meropenem per sopprimere la resistenza in vitro del Pseudomonas aeruginosa*). Antimicrobial Agents and chemotherapy, 49, 12, 4920-4927

Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Aarestrup, F.M. and Svendsen, O. (2002) Distribution

of enrofloxacin in intestinal tissue and contents of healthy pigs after oral and intramuscular administrations. (*Distribuzione dell'enroflaxicina nel tessuto e nel contenuto intestinale nei suini sani dopo la somministrazione orale e intramuscolare*). Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy, 25, 335-342

Veterinary Medicines Directorate (2008) Report: Sales of antimicrobial products for use as veterinary medicines, antiprotozoals, antifungals, growth promoters and coccidiostats in the UK in 2007. (*Vendita di prodotti antimicrobici per l'uso come farmaci veterinari, antiprotozoici, antifungini, promotori dela crescita e coccidiostati nel Regno Unito nel 2007*.)

ATTI DEL XXXV MEETING ANNUALE

GESTIONE DELLA SALA PARTO

Modena, 12-13 marzo 2009

L'IMPORTANZA DELLA FORMAZIONE DELL'IMPRENDITORE SUINICOLO, DEL METODO E DELLA PREDISPOSIZIONE NEL PERSONALE DELLA SALA PARTO PER PUNTARE ALLA MIGLIORE EFFICIENZA: ESPERIENZE DI CAMPO.

MAZZONI CLAUDIO
Medico Veterinario, Libero Professionista, Reggio Emilia3
mazzoni.claudio@alice.it

Gli ostacoli
sono quelle cose spaventose che vedi
quando togli gli occhi dalla meta
Henry Ford

Il passaggio dalla suinicoltura tradizionale a quella industriale sta vivendo, in questi anni, la fase più difficile o, usando un eufemismo, più delicata della sua storia. Molte aziende si sono trovate, ed altre si trovano tutt'ora, nella difficile situazione di decidere se continuare a lavorare nel settore oppure cedere l'attività. Il contesto arriva ad assumere toni davvero drammatici quando l'azienda è di estrazione famigliare e il cederla significa abbandonare la strada percorsa da diverse generazioni, con tutti i risvolti umani che una tale decisione comporta.
Per poter far fronte alle difficoltà del settore è necessario che l'allevamento, tradizionalmente conosciuto, si trasformi in un'impresa vera e propria. Viene da sé che l'allevatore si debba trasformare in imprenditore. Questo passaggio è stato, e continuerà ad essere, molto doloroso ed è una diretta conseguenza della globalizzazione anzi, più precisamente, della liberalizzazione del mercato europeo. In questo contesto l'Italia è andata incontro ad un processo di trasformazione che, da nazione all'interno dell'Europa, l'ha portata ad essere una regione dell'Europa stessa. Quindi siamo stati costretti a cambiare i nostri abituali partners di confronto, infatti non più Lombardia contro Emilia Romagna, ma Italia contro Olanda o Danimarca che se, almeno da un punto di vista calcistico ci vedono ancora frequentemente vincitori, questo non può essere detto in campo zootecnico, più in generale, e suinicolo in particolare.
Tutto sommato potremmo dire che, nonostante i lunghi anni di preparazione trascorsi prima dell'ingresso nel mercato unico, nessuno si è preso la briga di dirci come sopravvivere al suo interno e, dal canto nostro, nessuno di noi si è preso la briga di aggiornarsi vedendo come nelle altre nazioni venisse vissuta l'impresa suinicola. I motivi di ciò non sono facilmente spiegabili, certo la mancanza di aggregazione dei nostri allevamenti e gli enormi guadagni ottenuti nel passato possono solo aver accentuato quell'atteggiamento un po' "spavaldo" che ancora oggi, anche se sempre meno, ritroviamo in alcune realtà. Ma tant'è! Direi che ora stiamo imparando, anche se purtroppo, a nostre spese.

L'imprenditore suinicolo

Al proprietario dell'azienda moderna viene pertanto chiesto di abbandonare i panni dell'allevatore tradizionale, per assumere quelli del più responsabile imprenditore. Ma cosa intendiamo per imprenditore? È incredibile come spesso il grande dizionario Garzanti della lingua italiana possa venirci in aiuto, in effetti con poche parole viene racchiuso tutto il senso di questa nuova, quanto necessariamente emergente, figura professionale. *L'imprenditore suinicolo è chi esercita professionalmente un'attività economica organizzata al fine della produzione suinicola, che si avvale prevalentemente del proprio lavoro e dei familiari, e comunque di un nu-*

mero non grande di dipendenti. Ecco quindi la chiave di volta della faccenda, esercitare professionalmente, cioè con competenza, quindi conoscenza. Inoltre deve essere svolta in maniera organizzata, quindi programmatica, lasciando fuori solo quegli ostacoli, o meglio imprevisti, che come tali non sono prevedibili, ma che non debbono distogliere l'attenzione dalla meta finale. Per fare questo è importante che ci sia una struttura piramidale del personale, con un organigramma ben noto a tutti, dove i livelli decisionali siano indiscussi. Un'esplicazione di questa piramide è nella tabella 1.

Tabella 1 : Organigramma aziendale con i livelli decisionali

Organigramma aziendale	Livelli decisionali
Imprenditore	Dice cosa fare
Responsabile	Fa fare
Operaio	Fa

Ereditiamo così, da altri settori, l'importanza della formazione volta proprio a fornire quegli strumenti indispensabili per fare muovere, con cognizione di causa, la macchina "impresa" all'interno del mercato.
La formazione quindi deve essere in primis dell'imprenditore, e del responsabile, per poi ricadere fisiologicamente sugli operai, pochi o tanti che siano.
Vale la pena sottolineare un aspetto molto importante, **la formazione prescinde dall'esperienza**. Infatti non è detto che un imprenditore esperto, così come un operaio esperto, esercitino in maniera professionale le loro attività. Anzi molto spesso sono proprio le persone più giovani, quindi meno esperte, che manifestano una migliore propensione al formarsi professionalmente verso i nuovi sistemi di lavoro, poiché libere da preconcetti, soprattutto rispetto a chi, radicalmente convinto della "elevata qualità" della propria preparazione, mal si predispone all'apprendimento delle novità.
Il punto relativo alla formazione dell'imprenditore è assai delicato. Molto spesso si viene chiamati in azienda dallo stesso, per fare formazione al personale, salvo poi accorgersi delle lacune, grandi o piccole, proprio di chi è al vertice della piramide. A questo punto si pone il dilemma di come proseguire. Certo sarebbe imbarazzante fare notare all'imprenditore l'handicap, soprattutto davanti ai dipendenti, ma anche perseverare e trasmettere lo strafalcione alla manovalanza risulta altrettanto sbagliato. In questi casi mi piace ricorrere alla lettura dei dati informatizzati dell'azienda, congiuntamente con l'imprenditore. Questa operazione va condotta chiaramente lontano da occhi indiscreti, ma è essenziale per permettere un primo appianamento delle divergenze con i vertici aziendali, per proseguire così sullo stesso binario.
In alcune situazioni bisognerebbe richiedere un incontro preliminare con i vertici dell'azienda, soprattutto se sono trascorsi molti anni dall'ultimo incontro formativo o, come spesso accade, non è mai stato fatto prima. A volte sono proprio gli imprenditori stessi, solitamente i più lungimiranti, a richiederlo, ma rimane il fatto che la fase formativa deve obbligatoriamente essere realizzata anche dai vertici dell'azienda.
Questo passaggio è di importanza cruciale poiché, se chi è alla guida trasmette informazioni sbagliate, chi le mette in pratica non farà altro che perpetuare l'errore. Inoltre vale sempre la massima: "**non puoi esigere quello che non hai insegnato**". Ancora più grave è la situazione in cui, allorquando le informazioni apprese dal personale in sede di formazione non coincidessero con quelle impartite dall'imprenditore, si assisterebbe ad un difficile conflitto interno. In questo caso la manovalanza, costretta per forza di cose a eseguire le indicazioni

di chi la paga, potrebbe andare, con il passare del tempo, a dare sempre meno credito alle nuove informazioni, generando così confusione, situazioni sgradevoli ed in definitiva perdita di tempo da parte di tutti.

Il personale di azienda

Giunti a questo punto, dopo che l'imprenditore od il tecnico che ne fa le veci, sono professionalmente formati, sarà possibile pensare alla formazione del personale in azienda su cui si concentreranno le nozioni tecnico-pratiche. In questa sede sarà necessario fornire un **METODO** di lavoro, cioè un'organizzazione dello stesso, utile al personale per il corretto svolgimento delle propria attività lavorativa e per il raggiungimento degli obiettivi aziendali. Fondamentale, a mio giudizio, sarà impartire adeguate nozioni di fisiologia dell'animale, materia imprescindibile per poter capire come funziona il suino e quali sono i suoi bisogni (vedi oltre: "empatia").

Al personale devono essere dati degli **obiettivi** ben determinabili. Il dire semplicemente "miglioriamo il numero degli svezzati per parto" senza un'adeguata visione di insieme, non è oggigiorno più accettabile. Occorre che l'obiettivo sia *Semplice* quindi chiaro per tutti, ad esempio aumentare il numero di suinetti svezzati per parto. *Misurabile* cioè indicato da un numero disponibile per tutti, come passare da 9,8 a 10,3 suinetti svezzati per parto. Il concetto della misura di un dato, esprimibile con un numero od una percentuale, è molto importante e la raccolta di questi dati è sfortunatamente un argomento ancora male affrontato in molte aziende. *Sfidante* ovvero indicante la sfida che deve essere vinta per raggiungerlo, come ridurre la mortalità in lattazione per ottenere i 10,3 suinetti svezzati per parto. *Raggiungibile* quindi possibile, è chiaro che se la mandria delle scrofe è tropo anziana, o la natalità totale dell'azienda è di 12,0 suinetti per parto con 9,8 svezzati, aumentare gli svezzati per parto di uno 0,5 può rappresentare un primo obiettivo raggiungibile mentre arrivare subito a 11,0 è verosimilmente quasi impossibile. In un *Tempo limite*, cioè deve essere raggiunto in un tempo ritenuto adeguato, in rapporto anche agli sforzi economici sostenuti per perseguirlo.

Per cercare di rendere più raggiungibile l'obiettivo finale potrebbe essere utile inserire una tappa, quindi uno o più **obiettivi intermedi**, al fine di rendere più raggiungibile quello finale. Ad esempio passare a 10,0 svezzati per parto nei primi 2 mesi (obiettivo intermedio), fintanto che la mandria non si sia ringiovanita, per poi raggiungere i 10,3 dopo 4 mesi, quando inizieranno i parti delle scrofette introdotte (obiettivo finale).

A questo punto sarà necessario **motivare** ed **incentivare** il personale al fine di garantirsi quell'elemento fondamentale per il raggiungimento di qualsiasi obiettivo ovvero l'impegno. Sfortunatamente per molti imprenditori l'impegno delle proprie maestranze non si può comperare, ma si deve sempre conquistare. Non è un caso che all'apice della piramide di Maslow, che indica la scala di priorità del personale, vi sia l'auto-realizzazione e non il riconoscimento economico. Quindi il lavoro che l'imprenditore deve svolgere è molto più fine. In generale per garantirsi l'impegno delle proprie maestranze, al di la del raggiungimento degli obiettivi, è necessario coinvolgerle a vario grado nelle decisioni che riguardano l'azienda, dato che saranno loro a lavorarvi all'interno, cercando quindi di fare sentire proprie le decisioni finali. Il capitolo delle motivazioni è veramente molto ampio. Interessando i rapporti interpersonali, ovvero l'affetto con la proprietà e con i colleghi di lavoro quindi il celebrato spirito di squadra; la sicurezza e la qualità nell'ambiente di lavoro; la realizzazione delle necessità famigliari; il soddisfacimento economico e così via. Vedremo nel dettaglio un caso nel corso degli "esempi di allevamento" poiché la trattazione di tutti questi punti richiederebbe una dissertazione molto più ampia, comunque non oggetto del presente lavoro.

In conclusione potremmo dire che, seguendo un semplice ragionamento, un dipendente

motivato svolge le sue mansioni con impegno e con serenità consapevole di fare sempre il proprio meglio, e di essere messo nelle condizioni per farlo. Una volta rincasato, all'interno del focolare domestico, potrà manifestare il suo appagamento e la sua autostima. Ci si avvicina così molto al concetto di felicità, che possiamo così mirabilmente riassumere:

La felicità
non è avere quello che si desidera,
ma desiderare
quello che si ha.
Oscar Wilde

Oppure per chi ha una visione cristiana della vita

Il diavolo ha paura della gente allegra
Don Bosco

L'attività di formazione

L'attività di formazione ha il compito quindi di fornire un **METODO** di lavoro che è la chiave per il successo dell'impresa suinicola moderna, poiché incide direttamente sul livello di appagamento del personale. Infatti un tecnico, piuttosto che un operaio, ben preparati, quando applicano in campo quello che hanno imparato, ottenendo risultato, fortificano la loro autostima e si affezionano sempre più a coloro che periodicamente gli forniscono quegli strumenti formativi utili a migliorare quotidianamente la qualità del loro lavoro. L'attività di formazione dovrebbe essere di due tipi: *ciclica* e *quotidiana*. Nella prima, la cui cadenza può essere da trimestrale fino ad annuale, tutta l'azienda, dal proprietario ai tecnici fino agli operai, si sottopongono a corsi di formazione/aggiornamento per categoria di competenza. Mentre la seconda è quella che interessa la quotidianità, cioè la trasmissione di informazioni dal tecnico aziendale verso la manovalanza per ricordare e meglio mettere in pratica ciò che è stato appreso in sede di formazione ciclica.

A questo punto entrano in gioco le strutture, o meglio le figure tecniche, in grado di fornire questo tipo di preparazione professionale. A prescindere dal loro titolo di studio, tali tecnici, od anche consulenti che dir si voglia, dovrebbero essere in grado di fornire all'azienda un'assistenza a 360°, dalla formazione tecnica dell'imprenditore fino a quella tecnico-pratica del personale.

A tale riguardo mi preme sottolineare che in Italia manca fisicamente una scuola in grado di fornire questi strumenti, infatti se escludiamo il lavoro svolto nel corso degli anni da poche menti illuminate, presso le scuole, le APA o in alcuni allevamenti, o la brillante intuizione di alcuni colleghi stranieri che negli ultimi anni hanno portato una ventata di cultura in un settore avvizzito da tempo, la situazione non è delle più rosee. Manca insomma una struttura in grado di fornire una formazione professionale, *pratico-scientifica* e soprattutto continua. Per dirla tutta è anche mancata, da parte degli allevatori, la richiesta di una struttura in grado di fornire questo servizio, soprattutto perché vista più come una spesa che non un investimento. La speranza per il futuro è quella di vedere la nascita di più strutture di questo tipo, in grado di dare una risposta alle esigenze delle imprese suinicole che, dovendo sempre di più confrontarsi con il resto della "Nazione Europa", partono spesso svantaggiate poiché mal preparate.

Sala parto

Facendo un piccolo passo in dietro, mi piacerebbe spendere alcune parole sulla scelta del personale, cioè sulla individuazione di quegli uomini o donne che verranno messi a contatto

con le scrofe ed i suinetti della sala parto, a partire dalla preparazione delle sale fino allo svezzamento degli animali.
L'individuazione di questo personale è di fondamentale importanza per non vedere vanificati tutti gli sforzi realizzati durante i circa 114 giorni di gestazione.
In effetti non possiamo dimenticare che abbiamo a che fare con animali che in un qualche modo interagiscono con noi! Pertanto le domande a cui dobbiamo trovare risposta sono: esiste un meccanismo che regola i rapporti fra uomo ed animale? E se sì, è possibile conoscerlo, praticarlo e coltivarlo?
Quante volte abbiamo sentito, da parte dell'imprenditore, fare considerazioni del tipo: "Sono molto contento del lavoro di Mario, da quando l'ho spostato dalla gestazione alla sala parto riesco a svezzare più suinetti per scrofa di quanto non accadesse prima. E pensare che il suo spostamento in sala parto è stato un puro frutto del caso, infatti se non fosse andato in ferie chi lavorava prima di lui nel reparto, non avrei mai potuto provarlo e vedere così quanto è bravo". Frasi come queste ne abbiamo sentite e vissute direttamente molte. Il fattore dominante riguarda una difficoltà da parte dell'uomo di mettersi in rapporto con il reparto in generale, ma soprattutto con gli animali che lì vivono, questo a prescindere dalla formazione e dalle motivazioni in possesso dell'uomo.
Per tentare di dare una spiegazione, quanto più semplice possibile, di questi complessi meccanismi psicologici che regolano tali rapporti, ritengo possa essere di aiuto un interessante quanto corposo testo di filosofia, pubblicato dalla Prof.ssa Laura Boella, che insegna Filosofia morale presso l'Università degli Studi di Milano, dal titolo "Sentire l'altro" (2006, Raffaello Cortina Editore). Chiaramente nel teso della prof. Boella, non si parla di suini, anzi vengono presi in considerazione prevalentemente i rapporti fra gli esseri umani, tuttavia ritengo che i ragionamenti fatti dalla professoressa potrebbero tranquillamente essere riportati nell'ambito del rapporto uomo-suino.
Tutti sappiamo che il suino è un essere vivente, ma non tutti ci soffermiamo a riflettere sul fatto che anche il suino, come noi, è assoggettato all'esperienza, ovvero vive sentimenti ed emozioni e compie atti volontari. Una dimostrazione ne è il fatto che le scrofette messe per la prima volta in sala parto, spesso sono alquanto impaurite e agitate, proprio perché per loro è la prima volta in quegli ambienti. Ecco perché si ottengono buoni risultati alternandole con le scrofe più anziane che, avendo già una certa esperienza, trasmettono tranquillità alle giovani. Tutto questo avviene certamente ad un livello più basso di quanto non accada per l'uomo, ma pensare al suino come un oggetto inanimato ritengo che sia un'osservazione molto superficiale e le tante attenzioni date agli animali dai migliori tecnici, che fino ad ora ho conosciuto, ne sono una straordinaria conferma.
L'atto attraverso il quale ci rendiamo conto che il suino è soggetto ad esperienza è definito **empatia**. Questa è la corretta definizione per una parola che molti di noi hanno sentito spesso pronunciare, e che, come me, non avevano ben presente. L'importanza di tutto ciò risiede nel fatto che, capire quello che sente, vuole e pensa il suino, è un aspetto fondamentale per la convivenza fra uomo ed animale, nonché per la redditività dell'azienda.
Nel nostro caso l'empatia consiste nel proiettare i nostri sentimenti, i nostri stati d'animo e la nostra esperienza nel suino. In questo modo si attua un confronto fra le esperienze da cui necessariamente dobbiamo uscire vincitori, se non altro per una diversa posizione nella piramide alimentare. Chi, anche inconsapevolmente, pratica questa empatia, va verso l'animale quasi dovesse rispondere ad una sua richiesta. Il risultato finale è diventare tutt'uno con il suino, metaforicamente è chiaro, ma questo "sentire il suino" ha il suo cardine nella partecipazione emotiva e nel tentativo, da parte nostra, di superare quella notevole distanza che la

natura ci ha frapposto. L'empatia non coincide con la simpatia o la compassione, certo deve fare i conti con queste ed altre forme di partecipazione emotiva, ma è la capacità specifica di "sentire il suino". In particolare l'empatia passa dal *rendersi conto* dei bisogni del suino.
Nel mio modo di vedere le cose, questa empatia è sempre stata come un dono ricevuto da un'entità superiore di cui solo pochi potevano sentirne i benefici, quindi non credevo esistessero strumenti in grado di insegnarla. Confutando questo mio preconcetto ecco che la prof. ssa Boella delinea in tre passaggi fondamentali, il metodo per educare se stessi a comprendere l'empatia. Questi sono: 1) l'emozione dell'incontro, 2) immaginare e comprendere e 3) trasformazione di sé.
Nell'intento di agevolarne la comprensione, tutt'altro che facile, proverò a trasferirli in un contesto a tutti noi certamente più famigliare. Andiamo in sala parto durante una giornata di assistenza ai parti:

1. l'emozione dell'incontro: ci mettiamo in relazione con la scrofa che sta partorendo, muovendoci senza fare bruschi rumori ed usando un tono do voce pacato, cercando di focalizzare alcuni atteggiamenti dell'animale, agitazione, contrazioni, sbuffi, respirazione affannata in modo da confrontare la situazione con la nostra esperienza.
2. immaginare e comprendere: a questo punto è necessario comprendere il perché e le motivazioni di questi gesti. Quindi con l'immaginazione "entriamo" progressivamente nella scrofa e cerchiamo di condividerne l'esperienza facendoci anche delle domande. Ad esempio: sono contrazioni normali o c'è un ostacolo nel canale del parto? Dalle risposte passano la comprensione e la condivisione delle esperienze fra scrofa e uomo. È in questa fase dove un'adeguata formazione può davvero fare la differenza.
3. trasformazione di sé: è il momento della decisione e dell'eventuale azione. Il confronto e la fusione delle esperienze portano verso una decisione. "Sì! debbo intervenire, è troppo tempo che spinge invano", mi infilo il guanto ed esploro l'utero della scrofa, oppure "non è ancora ora di intervenire aspetto qualche minuto così da non disturbare l'animale".

Alla luce dell'esempio citato non vi sarà difficile capire il perché, nella maggioranza dei casi, i tecnici più indicati per le sale parto siano le donne, questo perché durante la fase di immaginazione e comprensione riescono meglio ad immedesimarsi negli animali, a capirne meglio i bisogni, proprio grazie ad un bagaglio di esperienze personali, ma condivisibili, come il parto e la gestione dei piccoli, forse anche di origine ancestrale, che i maschi per natura faticano ad acquisire. Il risultato finale è spesso la decisione giusta! Questo non toglie che vi siano anche degli uomini con uno spiccato senso materno, ma ritengo che sul grande numero le donno partano, in questo settore, avvantaggiate.
L'empatia può quindi essere coltivata, certo sarà più presente nelle persone con maggiore attitudine, ma anche quelle meno dotate possono avvicinarvisi con fiducia, proprio perchè deve essere considerata come un'essenziale capacità umana. Esercitarsi all'empatia verso il suino, comporta innanzitutto cercare una famigliarità con l'anatomia e la fisiologia dell'animale, quindi ritorna prepotentemente in gioco un corretta formazione. Inoltre è necessario imparare un po' di etologia, cioè il comportamento, proprio per riconoscere i movimenti, i fonemi e gli atteggiamenti, che sono l'unica forma di comunicazione che gli animali manifestano nei nostri confronti. Vi sarà certamente facile intuire come nell'esempio sopra citato sia importante il giusto grado di attenzione, per poter svolgere al meglio questi delicati passaggi mentali, soprattutto nelle persone meno vocate. Ecco che allora, anche la semplice distrazione dovuta alla partecipazione ad altre mansioni dell'azienda, può rivelarsi fatale. A questo punto entra in gioco l'adeguata formazione dell'imprenditore che, per evitare svarioni di questo tipo, soprattutto in oc-

casione della giornata dei parti, specie se sincronizzati, ed in aziende di grandi dimensioni o di piccole, ma gestite in banda e di conseguenza con molti parti da assistere, dirotta verso le altre mansioni un diverso personale.
Altri requisiti che credo siano importanti per il personale della sala parto, potrebbero essere il peso, quindi direi che una persona che non sia in grado di gestire il suo peso, quindi impacciata, non sia adatta a spostarsi velocemente da una gabbia all'altra, quindi a fare i baliaggi, ma anche le esplorazioni, per le quali è bene avere un braccio piccolo.
Nelle aziende con molto personale è spesso necessario avere un **Leader**. Con questo termine deve intendersi la persona che all'interno della squadra viene vista dagli altri operai come modello da seguire e cui fare riferimento quando non si sa o non si ricorda una cosa. Questi diventerà un possibile punto di riferimento anche per l'imprenditore poiché, convinto lui, sarà più facile avere il resto della squadra dalla nostra parte.
Esempi di campo
Abbiamo già sottolineato il ruolo del **METODO**, per organizzare i tempi di lavoro ed ora sappiamo che ci può educare anche verso l'empatia. Vediamo come applicarlo in campo
L'azienda numero 1 ha una consistenza numerica di circa 1.100 scrofe, alleva un ibrido spagnolo con rimonta interna, è possibile considerarla un sito uno, e, partendo dal maggio del 2008, ha subito una conversione in banda trisettimanale. Sfruttando le caratteristiche di questo sistema di lavoro, abbiamo potuto usufruire ben 4 operai del personale aziendale da gestire nella settimana dei parti (circa 125 parti ogni tre settimane). I dati aziendali ricavati da maggio a settembre del 2007, riassunti in tabella 2, indicavano un 7.7% di nati morti.

Tabella 2: Confronto fra il 2007 e le prime 4 bande dopo la formazione all'assistenza al parto. Il numero di nati morti rispetto ai nati totali è risultato maggiore nel periodo mag.set 2007 rispetto al periodo dalla 3° alla 6° banda in modo statisticamente significativo. Mentre nel medesimo periodo il numero di nati totali rispetto ai parti non è risultato differente.

	Magg.-Sett. 2007	Dalla 3ª alla 6ª banda
Parti	1014	622
Nati totali	12.857	8049
Nati vivi	11.859	7581
Nati morti	998	474
Nati totali/Parto	12.67	12.94
Nati morti/Nati vivi	7.76%	5.88%

A partire dalla fine di settembre del 2008, in coincidenza con i parti della 2ª banda, si è proceduto ad una prima seduta di formazione tecnica della proprietà seguita da un'altra tecnica-pratica con anche il personale della sala parto. In un secondo momento sono state formate 2 squadre. A partire dalla seconda, ma soprattutto dalla quarta banda, si sono cominciati a vedere i primi risultati. Da notare che i nati totali sono aumentati di 0.27 (anche se in maniera non significativa) per parto, ma la natimortalità è diminuita di quasi 2 punti percentuale (in maniera significativa). È stata poi approntata una tabella, accessibile a tutti, in cui vengono riportati i risultati ottenuti, affinché ci sia consapevolezza degli stessi.

Il riepilogo degli eventi è possibile seguirlo nella tavola 1. Per incentivare il personale è stato inserito un premio economico di 30,00€ cadauno, quando la natimortalità si attesta fra il 5 ed il 7%, che diventa di 50,00€ quando è inferiore al 5%.

Capitolo statistica:

Le differenze nei rapporti tra i valori produttivi misurati nei due periodi a confronto sono state confrontate utilizzando il test Chi^2 esatto di Fisher, con livello di significatività posto uguale a $p<0.05$.

Una possibile nuova frontiera!

È ormai a tutti ben nota la difficoltà, oserei direi atavica, di reperire personale più o meno qualificato nel nostro settore. I motivi sono diversi: gli orari rigidi o comunque poco flessibili, il lavoro durante il fine settimana, le strutture in cui si lavora non sempre invitanti, anzi a volte fatiscenti, l'odore e il grande livello di benessere raggiunto dalla nostra società, che mal vede l'avvicinarsi ad un ambiente così "sporco", sono forse solo alcuni dei motivi di questa disaffezione per un lavoro che certamente è onorevole tanto quanto gli altri, anzi a volte più gratificante. Ecco il perché sempre meno giovani si avvicinano al settore ed ecco perché è stato necessario sostituirli con manovalanza, nel 60% dei casi, di origine extracomunitaria. Il problema relativo alla gestione di questi operai è di molteplice origine, per individuare due fra i punti più importanti direi: la lingua innanzitutto ed il livello culturale, spesso molto modesto. Questi due aspetti, da soli, sono i principali elementi in grado di mettere in difficoltà la comunicazione con il responsabile o, direttamente l'imprenditore, figuriamoci un livello minimo di formazione. Questo non vuole dire che fra gli operai extracomu-

nitari non ci siano bravi tecnici, anzi tutt'altro, ma che ancora una volta sul grande numero non sia facile individuarne o quantomeno formarne. Questo fatto in combinazione con l'aumento degli allevamenti gestiti in banda, potrebbe generare una nuova categoria professionale, che potrebbe trovare un suo spazio vitale proprio in sala parto. Vediamo come.

Azienda numero 2. Un ciclo chiuso con il sito 3 collocato a circa 5 chilometri dal sito 1 e 2. Circa 400 scrofe; ibrido inglese, con rimonta interna; a gestione famigliare più due unità lavorative esterne, una all'ingrasso (con mangimificio annesso) ed una a "rimbalzare" fra sala parto e gestazione in aiuto ad uno dei proprietari; in banda trisettimanale dal novembre del 2005. Da allora è stato inserito un tecnico-veterinario che si è progressivamente occupato della fase delle adozioni precoci e sistematiche il pomeriggio della giornata dei parti.

Nel corso del dicembre 2007 si è ritenuto necessario ridurre di una unità lavorativa e si è optato per quella esterna della sala parto-gestazione. Le mansioni di lavaggio, castratura, vaccinazioni e tatuatura sono state affidate all'unità dell'ingrasso che, nella settimana prevista, facendo qualche ora di straordinario prima di recarsi all'ingrasso, riusciva a svolgere senza grossi problemi. In sua assenza la famiglia riusciva sempre a compensare. Rimaneva però la necessità di coprire una fase molto delicata quale quella dell'assistenza ai parti (circa 50 ogni tre settimane) che la sola famiglia non poteva ricoprire. Tale incarico è stato affidato ad una giovane veterinaria che, adeguatamente formata negli ultimi mesi del 2007, con un **METODO** ormai collaudato, in collaborazione con l'altro tecnico veterinario del pomeriggio per le adozioni sistematiche, ha permesso di raggiungere i risultati riportati nella tabella 3.

Tabella 3: Prestazioni zootecniche a confronto fra il 2006 ed il 2008. Il numero di nati morti rispetto ai nati totali è risultato significativamente minore nel 2008 rispetto al 2006, mentre il numero di nati totali rispetto ai parti, alle scrofe o soltanto rispetto alle scrofe produttive non risulta differente tra i due anni. Nemmeno il numero di svezzati rispetto ai nati vivi o ai parti è risultato statisticamente differente tra il 2006 e il 2008.

	2006	2008
Scrofe produttive (presenti)	397 (414)	357 (371)
Parti	951	878
Nati totali	13.189	12.671
Nati vivi	12.439	12.026
Nati morti	750	645
Nati totali/parto	13.86	14.43
Nati vivi/parto	13.07	13.69
Nati morti/parto	0.78	0.74
Svezzati/parto	10,91	11.66
Parti/scr/anno	2.39	2.45
Sv/scr/anno (presente)	26,07 (25.07)	28.68 (27.59)
Svezzati totali	10.383	10.239
Unità lavorative	5	4

Capitolo statistica:
Le differenze nei rapporti tra i valori produttivi misurati nei due periodi a confronto sono state confrontate utilizzando il test Chi^2 esatto di Fisher, con livello di significatività posto uguale a $p<0.05$.
Non è stato volutamente inserito il 2007 poiché fortemente penalizzato da una pesante circolazione virale durante i mesi di febbraio e marzo che non permettono di confrontare correttamente i dati con il 2008.
La preparazione delle sale è responsabilità dell'azienda, così come il protocollo di sincronizzazione dei parti, sempre monitorato dal veterinario. Mentre le figure tecnico-veterinarie coprono nella giornata dei parti: l'assistenza degli stessi, i baliaggi sistematici (fatti a 6 mani, quindi con il famigliare che si occupa della sala parto) ed il giro delle terapie. Ancora a carico della proprietà sono i baliaggi di rifinitura del 5°, 7° e quelli del 14° giorno. Per concludere un controllo a 7 giorni dal parto e la successiva raccolta dati allo svezzamento, permetteranno di valutare il lavoro nel complesso.
Questa soluzione si è già realizzata in un paio di aziende, e sta suscitando l'interesse di una terza. Al momento sembrerebbe di maggiore utilità nel contesto di aziende medio piccole, quindi fra le 400 e le 800 scrofe, preferibilmente organizzate in banda. Questo anche per un miglior rapporto costo/beneficio, visto il maggior numero di parti da seguire ed il minor numero di ripetizioni dell'evento durante l'anno. Con aziende di consistenza numerica superiore la presenza, comunque necessaria di un elevato numero di operai, mi sembra possa far propendere verso una scelta prevalentemente rivolta alla formazione ciclica del personale già presente.
Per le sue caratteristiche di attività medico itinerante, ritengo debba essere prevalentemente ad appannaggio dei veterinari. Sarebbero quindi professionisti altamente specializzati, con competenze di fisiologia, farmacologia e clinica che, adeguatamente formate, potrebbero fornire un servizio unico, o comunque difficilmente reperibile sul mercato. Il lavoro svolto si concentrerebbe nella giornata dei parti, per motivi organizzativi meglio se in banda, ogni 2, 3, 4 o 5 settimane. Sarebbe di grande impatto zootecnico e dovrebbe essere accompagnato, come detto nell'esempio 2, dal personale della sala parto che, rimanendo spesso a contatto con tali figure, avrebbe un aggiornamento costante e di ottimo livello.
Questa opportunità potrebbe essere rivolta a quei giovani colleghi che, animati dall'amore per gli animali e sprezzo della fatica, fossero interessati ad una professionale attività tecnico-scientifica di campo.

Vivi come se dovessi morire domani.
Impara come se dovessi vivere per sempre.
Gandhi

RINGRAZIAMENTI:
Si ringrazia il dott. Bonilauri Paolo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione diagnostica di Reggio Emilia, per la collaborazione.

PUNTI CHIAVE NEL CONTROLLO AMBIENTALE DELLA SALA PARTO

MIQUEL COLLELL

mcollell@marcoicollell.com
marco i collell s.l. Barcellona.

Parole chiave: Sala parto, clima ambientale, zona di comfort termico

Key words: Key words Delivery room, climatic control, zone of thermal comfort

Riassunto. In una sala parto convivono due animali di età molto diversa e con esigenze ancora più diverse. Prima di questo scenario se non abbiamo ben chiaro queste esigenze e non siamo in grado di soddisfarle falliremo clamorosamente la gestione della sala parto. In questo articolo si ripassano non solo le necessità termiche, ma vedremo anche i requisiti della ventilazione, nonché le caratteristiche che devono disporre le strutture dove vengono stabulati gli animali. Vedremo le strategie applicabili al fine di dare agli animali di ogni età ciò di cui hanno bisogno, e a tal proposito l'aiuto del nido (inteso come nido la zona in cui forniamo una temperatura superiore ai suinetti) al fine di dare quel extra di comfort termico che sarà fondamentale.

Abstract. In a farrowing room coexist two animals with very different ages and still different necessities. Looking at that if we do not know clearly these necessities and we know how to satisfy, we will fail. In this article the thermal necessities are reviewed at the same time as the necessities of ventilation, as well as the requirements that they have to have the facilities where the animals lodge. We will see the applicable strategies for each age. In this sense the aid of the nest (understanding like nest the zone in which gives temperature superior to the pig) to be able to give this extra of thermal comfort will be basic.

INTRODUZIONE

Il conflitto generazionale in una famiglia appare quando in uno stesso spazio si scontrano due generazioni (età) differenti. In quel momento si impattano due modi di capire il mondo radicalmente diversi. Il problema di questo conflitto è che, se non si riesce a gestirlo bene finisce per essere molto traumatico per il bene della famiglia.

Nella sala parto succede qualcosa di simile al conflitto generazionale, ma in questo caso alla base di tutto troviamo che i fabbisogni primari sono totalmente diversi. Da un lato abbiamo dei suinetti e dall'altro le scrofe, e ogni animale avrà le proprie necessità, che non solo dobbiamo capire, ma che abbiamo anche la necessità di soddisfare.

Affinché i parti possano avvenire in modo ottimale è condizione necessaria, ma non sufficiente, che le condizioni climatiche siano adeguate.

1. Le necessità termiche.

In maternità il conseguimento di una giusta temperatura per tutte le età che abbiamo presenti è particolarmente complesso. Nella sala parto devono, infatti, convivere due tipi di animali: le scrofe e i suinetti. Questi animali condividono gli stessi locali, ma ciascuno di essi ha esigenze climatiche molto diverse.
Le scrofe lattanti sono caratterizzate da una produzione molto alta di calore corporeo, infatti, la loro zona di comfort termico (ZCT) è tra 12° e 22° C. Al contrario, i suinetti necessitano di temperature ambientali molto più elevate. Quindi il suinetto neonato poiché ha ben pochi grassi di riserva ha bisogno di una temperatura ambiente di 34°-35° C.

Qui ci appare il primo problema, quando i suinetti sono in pieno confort le scrofe stanno soffrendo un eccesso di calore, che conduce le scrofe a una riduzione del consumo di mangime che va ad inficiarne la produzione del latte e la loro condizione fisica. Inoltre questo si traduce dopo lo svezzamento in una peggiore venuta in calore e in un'ovulazione meno efficiente.

D'altro canto se cercheremo di soddisfare le esigenze delle scrofe senza tener conto dei suinetti, avremo dei suinetti che presenteranno meno vitalità, saranno più letargici, e pertanto avranno un minor consumo di latte, cresceranno meno e avranno maggiori possibilità di essere schiacciati.

Per questi due motivi dobbiamo cercare di soddisfare le esigenze di entrambi. La domanda da un milione di euro è….come?

Per risolvere questo enigma avremo la necessità di giocare con due concetti. Da un lato con la temperatura ambiente per dare alla madre quello di cui ha bisogno e dall'altro lato con l'aiuto del nido daremo ai suinetti la temperatura in più che serve.

1. Temperatura dell'ambiente in sala parto (riguarda soprattutto le scrofe). Durante il tempo che le scrofe resteranno in maternità si possono distiguere tre periodi:

1.1. Periodo prima del parto: durante questo tempo la temperatura delle sale parto deve essere analoga a quella che la scrofa ha in gestazione: 16°-20°C. Questo dipende dal tipo di pavimento.

1.2. Periodo che inizia a partire dal primo parto della sala e che termina alla fine della nascita dell'ultimo parto: in questa fase si raccomanda di inalzare la temperatura ambiente di circa 4° C. Con questo aumento si cerca di creare un clima più confortevole per i suinetti e quindi di ridurne

la percentuale di perdita. Visto che queste temperature sono dannose per le scrofe, le manterremo solo per pochi giorni; approfitteremo, infatti, che proprio in questi giorni il consumo di mangime della scrofa è comunque minore, quindi non creeremo carenze nutrizionali. Dobbiamo ricordare che questa fase non dovrebbe mai essere prolungata per più di una settimana.

1.3. Periodo che va dall'ultimo parto nella sala fino allo svezzamento della scrofa: in questa fase la temperatura deve tornare a scendere. Ma questa diminuzione, deve essere realizzata in modo progressivo arrivando al minimo nel momento dello svezzamento.

Il pavimento svolge un ruolo importante e determina differenze in funzione del tipo di materiale utilizzato, dalla paglia al grigliato.
Temperature raccomandate in sala parto (° C)

Tipo di pavimento	Pre-parto (fase 1)	Parto (fase 2)	Svezzamento (fino 3ª fase)
Paglia	16°	18°	16°
Fessurato parziale	18°	20°	18°
Fessurato totale	20°	22°	20°

2. Temperatura del nido (riguarda solo i suinetti). I suinetti neonati hanno ben poco grasso sottocutaneo perciò non dispongono di una buona capacità di isolamento. Alla nascita sono senza peli, umidi, e con poca riserva di glicogeno questo fa si che la loro resistenza al freddo sia molto piccola. La maggior parte dei suinetti perde temperatura corporea nei primi trenta minuti di vita. In alcuni casi questa perdita è recuperabile mentre in altri il risultato è la morte per ipotermia. Questa è la principale causa di morte durante l'allattamento, tutto ciò che viene fatto per ridurne l'impatto darà un esito positivo.

La temperatura ottimale del nido dei suinetti dopo il parto è di 35° C. Tuttavia anche se forniremo questa temperatura alla zona nido questo non sarà ancora sufficiente La ragione è che durante i primi due giorni di vita la tendenza naturale dei suinetti è di addormentarsi vicino alla mammella della madre dopo la poppata e sarà solo dopo il terzo giorno che tenderanno a dirigersi nel settore per loro predisposto. Per questo motivo è opportuno adottare altre misure quali:

2.1. Aumentare leggermente la temperatura della sala parto.
2.2. Predisporre un tappeto in grado di isolare i suinetti dal suolo durante il parto.
2.3. Collocare una lampada dietro la scrofa durante il parto.
2.4. Spostare la lampada al lato della scrofa per avvicinare i suinetti verso il nido nel corso delle prime 48 ore.

Al crescere dei suinetti, la temperatura del nido partendo dai 35ºC della prima settimana, scenderà a 28°C la seconda settimana e a 25°C la terza.

2. La ventilazione

Purtroppo la ventilazione quando parliamo di ambiente nella sala parto solitamente viene dimenticata, si potrebbe dire che noi decidiamo sotto la "dittatura della temperatura, " talvolta questa ossessione ci condiziona al punto di farci dimenticare l'importanza della ventilazione. Visto che, in sala parto siamo interessati ad ottenere l'ambiente ideale per la scrofa, ma nello stesso tempo anche per i suinetti, abbiamo bisogno di un sistema di ventilazione che permetta di ventilare ad un livello minimo nei mesi freddi e al massimo in estate per mantenere una temperatura adeguata (la produzione di calore di una scrofa lattante è, almeno, il doppio di quello che genera una scrofa durante la fase di gestazione).

La ventilazione sarà assolutamente necessaria per eliminare dall'ambiente gas e polveri che vengono prodotte nel reparto maternità. Tra questi, desideriamo evidenziare CO, CO2, NH3…
Questa realtà ci obbligherà all'uso di sistemi di ventilazione meccanica in questa fase.

Esigenze di ventilazione (m^3/scrofa + nidiata/ora)

Fase di lattazione	ventilazione minima	ventilazione massima
Nascita – 8 giorni	40-50	180-250
8 giorni – 15 giorni	50-60	180-250
15 giorni - svezzamento	60-80	180-250

Il mantenimento di un flusso d'aria, senza correnti e una corretta distribuzione sarà essenziale per il buon funzionamento delle sale.

3. Installazioni

Come regola generale si dovrà dimensionare la sala parto sulla base del lotto di produzione utilizzato, ma in allevamenti con più di 2.000 scrofe riproduttrici si consiglia di avere a disposizione due sale parto per ogni lotto in modo da poter suddividere i lavori di pulizia, e ottimizzare la gestione delle scrofe. Attualmente, il concetto nord americano in questo settore è di disegnare le sale parto con una capacità di 20-24 scrofe e di svezzare 4-5 volte alla settimana.

Secondo la legislazione attualmente in vigore nella U. E., i livelli di rumore nella sala parto (rumore generato dagli impianti di ventilazione, dal sistema di alimentazione, ecc.) deve rimanere al di sotto di 85 decibel. Alcuni studi mostrano che, le scrofe esposte a livelli di rumore simili o superiori al valore indicato, possono ridurre la produzione di latte.

Un aspetto molto importante della gabbia parto è quello di consentire i movimenti del corpo delle scrofe mentre è sdraiata. La larghezza della gabbia deve essere regolabile per dare più spazio ai suinetti all'aumentare del loro accrescimento. Durante

il parto la gabbia di contenimento della scrofa deve essere stretta in modo da obbligarla a coricarsi lentamente e ridurre quindi il rischio di schiacciamento dei suinetti. Le barre d'acciaio della gabbia devono essere orizzontali e facilitare l'accesso della scrofa. La barra inferiore deve avere barre di contenimento della scrofa poste in verticale, fatte in modo da non ostacolare le poppate.

Tra le caratteristiche da evidenziare:

. Dimensioni della gabbia parto di 2,7 x 1,8 m.
. La lunghezza della gabbia di contenimento della scrofa di 200-210 cm e di una larghezza regolabile da 35 a 90 cm.
. Ispezione facile dei suinetti.
. Una pulizia senza sforzo.
. Fornire un'adeguata superficie calda per i suinetti.

Il pavimento delle gabbie parto non dovrebbe mai essere una causa di lesione sia per le scrofe ché per i suinetti, non dovrebbe mai essere scivoloso nella zona destinata alla scrofa (se si parla di fessurato dovrà essere preferibilmente in ghisa con rapporto a 10/10 mm) e dovrebbe contribuire a mantenere una buona igiene.

Le gabbie parto con pavimento pieno aumentano le emissioni di ammoniaca rispetto a quelle con pavimento fessurato, ma sono più facili da pulire. Le gabbie parto con pavimento fessurato hanno il vantaggio di provocare con minore frequenza lesioni, e che la temperatura e l'emissione di ammoniaca sono più facili da controllare, rispetto a quelle con pavimento pieno. Dobbiamo notare una cosa importante, non esiste sperimentazione in grado di dimostrare che il sollevamento del fondo, nell'area della scrofa, al fine di evitare lo schiacciamento dei suinetti porti a un miglioramento su questo problema né che le performances generali della gabbia migliorino.

L'abbeveratoio dovrebbe fornire alla scrofa tra 10-13 litri/minuto. Le mangiatoie delle scrofe devono avere una forma che sia adatta alle loro anatomie (testa) e ai loro movimenti al pasto. In generale, devono avere una capacità di almeno 20 litri. La progettazione delle mangiatoie dovrebbe essere pensata in modo da renderle facili da pulire, senza angoli ciechi o spigoli vivi che possano ferire la scrofa.

Bibliografia

BOE número 278, RD 1135/2002 (2002) Normas mínimas para la protecc6n de credos Boletín Oficial del Estado del 20 de noviembre del 2002.

CD-ROM, (2003). Reproductive Management of Pigs, Guides and Problems Solving, Second Edition CD-ROM copyright © 2003 SUS Multimedia Publications.

Danish Pig Production (2001). The farrowing section. The National Committee for Pig Production, Annual Report 2001 p.18-19, 35,40-45.

English P., et al. (1985). La cerda: como mejorar su productividad. 118-233.

Knox, R. (2002). Improving Farrowing Management. Sow Management Short Course Proceedings. December 2002. University of Missouri, University of Illinois, Ohio State University. http://porkinfo.osu.edu/

Moore, C. (2005). Parity segregation. Proceedings of London Swine Conference, April 6th and 7th, 20057 London, Ontario, pp.61-68.

Pedersen B.K. (2007). Dimensiones y diseño de la sala de partos. Danish Farm Design, Dannmark. Disponible en http://www.3tres3.com

Peet, B. (2006). Farrowing room: the ultimate feeding program. Proceedings of Saskatchewan Pork Industry Symposium 2006, November 14th and 15th, pp.19-21.

Kolbfenstein, C., Farmer, C., Martineau, G.P. (1999). Diseases of swine 8th edition. Diseases of mammary glands and lactation problems Capítulo 58, Iowa State University Press.

Straw, B.E., Dewney D.E y Wilson M.R. (1999). Diseases of swine 8th edition. Diferential diagnoses on swine diseases Capítulo 3, Iowa State University Press.

ALIMENTAZIONE E PATOLOGIE DELLA SCROFA E DEL SUINETTO IN SALA PARTO

NOVARTIS
ANIMAL HEALTH

Curiamo i vostri animali al meglio perchè rendano al massimo.

Novartis Animal Health è un'azienda multinazionale specializzata nella ricerca e commercializzazione di prodotti farmaceutici veterinari. In Italia opera già ormai da molti anni negli animali da compagnia e da oggi, con l'introduzione di antibiotici per i suini e per gli avicoli, è presente anche nel settore della salute degli animali da reddito.
Novartis Animal Health orienta la sua offerta di soluzioni terapeutiche d'avanguardia nel rispetto dei più rigidi standard di eccellenza qualitativa, ponendo sempre maggior attenzione alle implicazioni che queste possono avere sulla redditività delle produzioni zootecniche.

Novartis Animal Health S.p.A.
Largo Boccioni, 1 - 21040 Origgio (VA)
Tel. 02.96543138

LA NUTRIZIONE FUNZIONALE IN SALA PARTO

PROF. VITTORIO DELL'ORTO

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare,
Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Milano
e-mail:vittorio.dellorto@unimi.it

INTRODUZIONE

La scoperta negli alimenti di molecole funzionali ad attività extra-nutrizionale ha aperto la strada ad un'alimentazione non solo mirata al soddisfacimento dei fabbisogni nutritivi, ma anche finalizzata ad apportare sostanze in grado di migliorare lo stato di salute dell'uomo e degli animali. Le sostanze bioattive contenute negli alimenti funzionali e capaci di apportare benefici all'organismo possono anche essere definite come sostanze nutraceutiche.

Per il suo significato fisiologico il latte *in primis* può essere considerato "alimento funzionale", in quanto non solo fornisce principi essenziali per la crescita e lo sviluppo durante la vita neonatale e la prima infanzia, ma rappresenta anche una fonte di molecole bioattive, con proprietà immunologiche, antinfettive, nonché funzioni essenziali per lo sviluppo del neonato, le cui influenze protettive si riflettono sullo stato di salute di chi lo consuma anche in età adulta.

Fra le componenti native del latte, di particolare rilievo e interesse sono alcune ascrivibili alla frazione proteica e lipidica, incluse tra queste anche alcune componenti di tipo vitaminico. L'importanza di questi composti è dettata non solo dal loro contenuto ma anche dalla loro bioaccessibilità e biodisponibilità (Baldi e Pinotti, 2008), spesso influenzate positivamente dalla loro inclusione in una matrice lattea. Nella valutazione dell'attività funzionale del latte va ricordata inoltre l'attività protettiva della componente oligosaccaridica nei confronti degli agenti infettivi intestinali. La sostanziale ridondanza e sinergia di componenti attive protettive conferma il ruolo centrale dei componenti del latte nel supportare lo sviluppo del neonato. L'attività dei diversi componenti protettivi del latte sull'ecosistema intestinale, nonché la loro capacità di operare insieme al sistema immunitario in via di sviluppo del neonato, riducono i rischi di insorgenza di problematiche sanitarie e migliorano le performance. Tali componenti potrebbero avere una potenzialità di impiego come nutraceutici, sia in relazione alla loro presenza negli alimenti, sia come additivi alimentari in grado di garantire una maggiore continuità durante le fasi iniziali dello svezzamento che, non va dimenticato, rappresenta sempre un "processo e non un evento". In questo campo, le conoscenze sono maggiormente sviluppate per quanto riguarda il latte umano o bovino, mentre meno noti o assenti sono i dati relativi al latte di scrofa e di altre specie.

Questo articolo rappresenta una breve *overview* delle componenti bioattive nel latte, con particolare riferimento alle componenti proteiche, lipidiche e saccaridiche, e di altri nutraceutici, quali estratti vegetali e fitoderivati, i cui effetti positivi sono stati testati, con particolare riferimento alla nutrizione in sala parto.

Peptidi bioattivi

Da tempo è noto l'effetto positivo della caseina e dei suoi derivati di idrolisi sulle performance di crescita dei suinetti (Pettigrew *et al.,* 1977a; Pettigrew *et al.,* 1977b; Pettigrew *et al.,* 1977c;).

In uno studio recente (YongJiu *et al.,* 2006) è stato osservato un effetto degli idrolisati di caseina sullo sviluppo del tratto gastroenterico nei suinetti neonati. I suinetti alimentati con latte bovino e idrolisati di caseina presentavano un maggiore sviluppo dello stomaco e dell'intestino tenue e differenze nella morfologia intestinale, con un'altezza dei villi/profondità delle cripte duodenali significativamente più elevati.

Nei suinetti neonati con ritardo di crescita intrauterino, l'impiego di idrolisati di caseina ha stimolato la proliferazione delle cellule epiteliali intestinali e migliorato la loro funzionalità, con un aumento dell'attività totale della maltasi intestinale (Feng *et al.,* 2006).

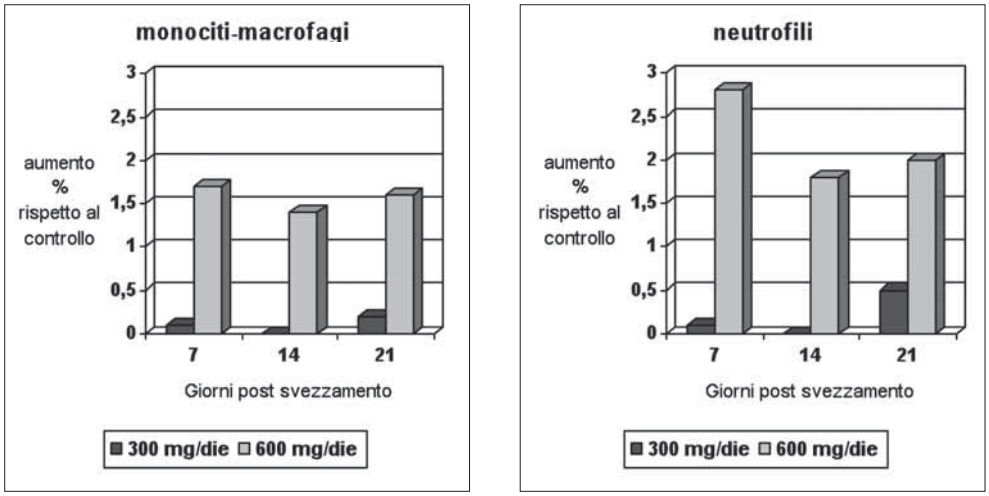
Tuttavia l'ottima digeribilità e il valore biologico delle proteine del latte non sono sufficienti a spiegare alcuni aspetti del loro valore funzionale, in particolare il ruolo antinfettivo e di miglioramento della risposta immunitaria. Recentemente è stato dimostrato che tali aspetti possono essere ascrivibili all'attività biologica di alcuni peptidi presenti in forma latente nel latte (Meisel, 2005). Peptidi bioattivi possono essere generati dall'idrolisi di tutte le maggiori proteine del latte, tuttavia due specifiche aree della β-caseina (residui aminoacidici 60-70 e 191-202) rappresentano "zone strategiche" di *cleavage* enzimatico che permettono di ottenere diversi peptidi con proprietà multifunzionali.

I peptidi immunomodulatori hanno rappresentato in questi anni un promettente settore di ricerca per le possibilità applicative in alimentazione animale. Un significativo numero di studi ha dimostrato l'efficacia di tali peptidi nel modulare e guidare la risposta immunitaria in sede intestinale nel neonato, fino al raggiungimento della piena maturazione (Baldi *et al.*, 2005). Nel primo periodo di vita tali peptidi possono rivestire un ruolo essenziale nello sviluppo della tolleranza alimentare nei confronti degli antigeni presenti negli alimenti, mentre tale tipo di tolleranza immunologica non riguarderebbe gli antigeni patogeno-derivati. Quest'ultima è fondamentale per evitare la ben nota suscettibilità dei neonati alle infezioni. (Hill, 1987).

Chronopoulou *et al.* (2006) hanno dimostrato una aumento della produzione di anioni superossido da parte dei macrofagi e neutrofili isolati da suinetti allo svezzamento, fondamentale per l'azione citotossica nei confronti dei patogeni, in seguito a trattamento con peptidi della caseina.

Politis e Chronopoulou (2008) hanno testato *in vivo* l'effetto dei peptidi della caseina sull'attività delle cellule fagocitarie in 27 suinetti nella prima fase post svezzamento, suddividendoli in tre gruppi sperimentali: un gruppo di controllo (nessuna integrazione), un gruppo con basso livello di integrazione (300 mg/die), un gruppo con alto livello di integrazione (600 mg/die). La produzione di anioni superossido da parte di monociti, macrofagi e neutrofili ematici ottenuti da campioni di sangue prelevati al giorno 7, 14 e 21 del periodo di prova, è risultata aumentare all'aumentare del livello di integrazione (*figura 1*).

Figura 1. Effetto della somministrazione di peptidi della caseina a suinetti svezzati sulla produzione di anioni superossido da parte di monociti-macrofagi e neutrofili (da Politis e Chronopoulou, 2008, modificato).



In uno studio condotto in topi, Matar *et al.* (2001) hanno dimostrato che i peptidi generati dalla caseina per azioni di proteasi batteriche sono responsabili dell'aumento di IgA nel piccolo intestino e nel tessuto bronchiale di topi alimentati con latte fermentato con *Lactobacillus helveticus.*

Lattoferrina

Le proteine del latte e in particolar modo le sieroproteine svolgono notoriamente funzioni extranutrizionali, come riportato in tabella 1. Tra queste, particolare interesse riveste la lattoferrina, proteina multifunzionale coinvolta nei meccanismi di difesa immunitaria aspecifica, nel trasporto del ferro e nei processi antinfiammatori (Brock, 2002).

Tabella 1. Funzioni biologiche delle principali proteine del latte (adattato da Séverin e Wenshui, 2005).

Proteine	***Funzione***
Caseine (α-, β-, κ-caseina)	Carrier di ioni (Ca, PO4, Fe, Zn, Cu), precursori di peptidi bioattivi
Sieroproteine	
β-Lattoglobulina	Carrier del retinolo, legante acidi grassi, possibile antiossidante
α-Lattalbumina	Sintesi del lattosio nella ghiandola mammaria, carrier del Ca, immunomodulatore, anticarcinogeno
Immunoglobuline (A, M e G)	Immunoprotezione
Lattoferrina	Antimicrobico, antiossidativo, immunomodulatore, assorbimento del ferro, anticarcinogeno
Lattoperossidasi	Antimicrobico
Lisozima	Antimicrobico, azione sinergica con immunoglobuline e lattoferrina
Glicomacropeptide	Antivirale, bifidogenico

Estremamente resistente alla degradazione enzimatica, la lattoferrina ingerita raggiunge quasi integra l'intestino, dove, interagendo con un recettore localizzato sulle cellule enteriche, facilita l'assorbimento del ferro.
Il ruolo fisiologico della lattoferrina nella modulazione della microflora intestinale assume particolare importanza per il mantenimento della funzionalità intestinale e per la prevenzione delle patologie gastroenteriche nei neonati. Studi *in vitro e in vivo* hanno dimostrato un'attività antimicrobica ad ampio spettro della lattoferrina nei confronti di batteri patogeni (Nuijens *et al.,* 1996) e un supporto prebiotico per microrganismi benefici come i bifidobatteri e i lattobacilli (Griffiths *et al.,* 2003). L'attività antimicrobica della lattoferrina viene comunemente attribuita alla sua capacità di legare e sequestrare il ferro, la cui carenza limita la crescita di batteri quali *Escherichia coli* (Dionysius *et al.*, 1993) e *Bacillus spp.* (Oram e Reiter, 1968). In uno studio condotto da Pecorini *et al.* (2005), l'attività antibatterica di lattoferrina ricombinante porcina è stata testata su 5 ceppi di *E. coli* isolati da suinetti sotto scrofa con diarrea. I test *in vitro* hanno mostrato un effetto inibitorio della lattoferrina ricombinante sulla crescita batterica del 30% alla concentrazione di 0,1 mg/ml.
Studi condotti nei vitelli (Van Leeuwen *et al.,* 2000) hanno evidenziato, in seguito a somministrazione di lattoferrina combinata con il sistema lattoperossidasi, una riduzione del numero di CFU (Unità Formanti Colonia) di *E. coli* del 20% nel colon (trattamento 4,2 log CFU vs controllo 5,3 log CFU, $P<0,1$) e del 6% nelle feci (trattamento: 7,0 log CFU vs controllo 7,5 log CFU, $P<0,05$).
Teraguchi *et al.* (1995) hanno dimostrato che, nel topo, la somministrazione di latte integrato con lattoferrina bovina riduce la proliferazione intestinale di *Clostridium spp*.

Frazione lipidica: CLA immunomodulatori

La frazione lipidica è una delle componenti del latte più studiata per quanto concerne i composti bioattivi ad azione nutraceutica (Molkentin, 1999; German e Dillard, 2006). Recentemente, l'interesse per le applicazioni nutraceutiche dei prodotti derivati dal latte si è focalizzato sui CLA, coniugati dell'acido linoleico. I CLA sono un gruppo di acidi grassi poliinsaturi, isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico, per i quali sono stati dimostrati numerosi effetti benefici per la salute, sulla base di studi sperimentali su modelli animali, inclusi effetti anticarcinogenici, antiaterogenici, antidiabetici e antiadipogenici (Belurt, 2002).
I CLA somministrati a scrofe in gestazione e in lattazione vengono secreti nel latte e nel colostro e possono essere così assunti dai suinetti (Bee, 2000).
Gli effetti immunomodulatori dei CLA nella scrofa e nel suinetto sono stati studiati solo recentemente. Bontempo *et al.* (2004) hanno osservato, in seguito a somministrazione di CLA (0,5%) a scrofe in tarda gestazione e nella successiva lattazione, un aumento significativo delle IgG nel colostro (*tabella 2*). La somministrazione di CLA ha anche influenzato la composizione acidica della componente lipidica del colostro, determinando un aumento degli acidi eicosenoico e eicosatrienoico e una riduzione degli acidi palmitoleico e γ-linolenico.
Inoltre, è stato osservato un effetto positivo sui parametri immunologici sia della scrofa che del suinetto. In particolare, la somministrazione di CLA alle scrofe ha prodotto un aumento significativo dei livelli sierici di lisozima e di IgG (circa 1,5 volte superiori rispetto al controllo, *tabella 2*); anche nei suinetti i livelli sierici di lisozima e di IgG sono aumentati significativamente (quasi 2 volte rispetto al controllo), in seguito all'im-

piego dei CLA nelle scrofe (*tabella 3*). Questi dati suggeriscono un possibile ruolo dei CLA come "stimolatori immunitari" nei suinetti che non hanno ancora sviluppato una risposta immunitaria specifica.

Tabella 2. Effetto della somministrazione di CLA (0,5%) sui livelli di IgG nel colostro e sulle variabili immunologiche nel siero delle scrofe (Bontempo et al., 2004).

	Giorni di lattazione				P values2
	0	**2**	**10**	**20**	
IgG nel colostro, g/L					
Controllo	33,59				0,013
CLA	49,44				
IgG sieriche, g/L					
Controllo	-	10,78	14,98	17,41	0,005
CLA	-	20,85	21,33	25,06	
Lisozima sierico, mg/L					
Controllo	-	0,996	1,398	1,462	0,025
CLA	-	1,866	2,013	2,256	

Tabella 3. Effetto della somministrazione di CLA alle scrofe sulle variabili immunologiche nel siero dei suinetti (Bontempo et al., 2004).

	Giorni di lattazione			P values2
	2	**10**	**20**	
IgG sieriche, g/L				
Controllo	22,92	12,28	9,8	0,001
CLA	29,40	20,86	16,22	
Lisozima sierico, mg/L				
Controllo	0,47	0,50	1,29	0,001
CLA	0,65	0,71	2,19	

Oligosaccaridi e glicani: ecosistema intestinale

Nonostante il lattosio sia stato isolato dal latte nel 1633, è solo agli inizi del '900 che è iniziata l'attività di ricerca sulle frazioni di carboidrati nel latte, con le successive caratterizzazioni sistematiche delle diverse componenti oligosaccaridiche. I glicani sono carboidrati complessi presenti nel latte come oligosaccaridi o come glicoconiugati, glicolipidi, mucine e glicosamminoglicani. Il profilo composizionale degli oligosaccaridi è maggiormente noto per il latte umano (Newburg *et al.,* 2005), bovino (Tao *et al.,* 2008) e ovicaprino. Il latte umano è unico in relazione alla quantità di oligosaccaridi complessi che contiene (5-20 g/L) (Gnoth *et al.,* 2000; Séverin e

Wenshui, 2005) e tipologia. Nel latte bovino, la concentrazione è molto più bassa (0.7-1.2 g/L, Veh *et al.,* 1981).
Gli oligosaccaridi rappresentano una classe di molecole bioattive che sta acquisendo un notevole interesse scientifico e commerciale in relazione alle sue proprietà fisiologiche, in grado di creare un ecosistema intestinale meno accessibile alla colonizzazione da parte di batteri patogeni, che contribuisca a prevenire l'insorgenza di patologie. Le evidenze derivano dall'umana e in particolare da studi che hanno rilevato una minore incidenza di diarree, allergie ed altri problemi sanitari nei bambini allattati con latte materno (Tao *et al.,* 2008). L'attività protettiva degli oligosaccaridi verso agenti infettivi intestinali risulta in parte legata alle loro caratteristiche prebiotiche, ma anche alla loro capacità di inibizione del legame tra agenti patogeni e cellule intestinali (Newburg *et al.,* 2005).
Il prerequisito alla base dell'attività prebiotica degli oligosaccaridi è che rimangano indigeriti nel piccolo intestino e siano pertanto in grado di modulare la crescita della microflora non patogena. In prove di digeribilità *in vitro*, Gnoth *et al.* (2000) hanno dimostrato come non si verifichi una sostanziale digestione di oligosaccaridi isolati da latte umano da parte di enzimi digestivi intestinali in un range fisiologico di tempi di incubazione, pH ed attività enzimatica. Tali risultati sono stati confermati anche da prove effettuate in vivo nell'uomo (Kunz e*t al.,* 2000).
Dai dati riportati in tabella 5 si evince come la componente oligosaccaridica del latte umano sia in realtà costituita da una complessa miscela di frazioni attive (centinaia nel latte umano), ognuna delle quali è in grado di inibire l'attività solo di uno specifico patogeno o di una famiglia di patogeni e di inattivare tossine. È stato dimostrato un effetto protettivo degli oligosaccaridi, soprattutto quelli fucosilati. Tale componente è risultata in grado di ridurre la mortalità dovuta a diarrea indotta da enterotossina di *Escherichia coli* (Newburg *et al.* 1990). Alcuni glicoconiugati contengono inoltre epitopi in grado di legarsi a specifici patogeni e pertanto possono competere con i siti di legame dei patogeni bloccando l'adesione di questi ai recettori della mucosa intestinale (Newburg *et al.,* 2005). Evidenze in tal senso sono state osservate in termini di inibizione dell'adesione alla mucosa intestinale da parte di *Escherichia coli, Campylobacter,* rotavirus, norovirus. Alcune componenti oligosaccaridiche bioattive non sono presenti ad esempio nel latte bovino. Da qui quindi la necessità di isolare e caratterizzare in modo dettagliato la struttura chimica delle diverse frazioni in relazione alla specie animale, al fine di poterne prevedere un utilizzo mirato nella specie suina.

Tabella 4. Latte umano: glicoconiugato con attività di inibizione dei patogeni (adattato da Newburg et al., 2005; Séverin e Wenshui, 2005).

Glicoconiugato	Patogeno	Meccanismo	Concentrazione(*)
GM1	*Vibrio cholera* *Campylobacter jejuni*	Legame con tossina	180 µg/L
GM3	*E. coli* enteropatogenico	Legame con tossina	13 mg/L
Gb3	Shiga toxin	Legame con tossina	100-150 µg/L
Condroitin solfato	Virus immunodeficienza umana	Legame con virus	6 mg/L
Lactaderina	Rotavirus	Legame con virus	100 µg/L
Mucina	*E. coli*	Legame con patogeno	1 g/L
Glicopeptidi mannosilati	*E. coli* enteroemorragico	Legame con tossina	60 mg/L
Oligosaccaridi	Streptococcus pneumoniae *E. coli* enteropatogenico *Listeria monocytogenes* *Clostrium spp.* *Campylobacter jejuni* Rotavirus	Legame con patogeno “ ?? Prebiotico Legame con patogeno Prebiotico	0.2-10 g/L 3 g/L 3 g/L
Oligosaccaridi fucosilati	*Campylobacter jejuni* *Vibrio cholera* *E. coli* enterotossina	Legame con patogeno	1-25 mg/L 1-25 mg/L 40 µg/L
Glicoproteine associate a macromolecole	Norovirus *Pseudomonas aeruginosa*	Legame con patogeno	370 mg/L
Sialillactosio	Cholera toxin *E. coli* *P. aeruginosa* Virus influenza Poliomavirus *Helicobacter pylori*	Legame con tossina	200 mg/L

(*) Concentrazione della frazione attiva o componente del latte

Impiego di estratti naturali come fattori di protezione

Un emergente approccio in termini di nutrizione funzionale è rappresentato dall'impiego di estratti vegetali quali modulatori della risposta immunitaria aspecifica. Alcuni di questi effetti possono essere ascritti anche alla funzione antiossidante dei principi attivi di origine vegetale.

Esistono considerevoli prove circostanziali che mettono in relazione l'insorgenza di numerose patologie di tipo infiammatorio e infettivo con una diminuzione dello *status* ossidativo degli animali e con un incremento del danno ossidativo. Oltre ai ben noti antiossidanti nutrizionali, quali la vitamina E, la vitamina A, il selenio e altri micronutrienti, recentemente si è posto l'accento su altre molecole ad attività antiossidante presenti negli estratti vegetali, come i flavonoidi e i composti fenolici, di cui si riporta un elenco in tabella 5. Per alcune di queste sostanze è noto il ruolo antiossidante, mentre

per altre il meccanismo d'azione non è del tutto chiarito, ma comunque rappresentano un fattore dietetico di protezione.

Tabella 5. Sostanze naturali ad attività protettiva.

Famiglia	Fonte	Sistema antiossidante	Effetti
Carotenoidi (luteina, Licopene)	Mais, frutta, pomodori	*Singlet oxygen quencer,* antiossidanti secondari	Risposta immunitaria
Metaboliti vegetali secondari - Flavonoidi (flavoni, flavononi) - Fenoli - Sulfidi/tioli	Uva, mele, agrumi, cerali, aglio, cipolla, rosmarino [oli essenziali]	*Chain breaker, chelanti* metallici, *scavenger* dei radicali liberi e dei superossidi	Epatoprotettori Risposta immunitaria

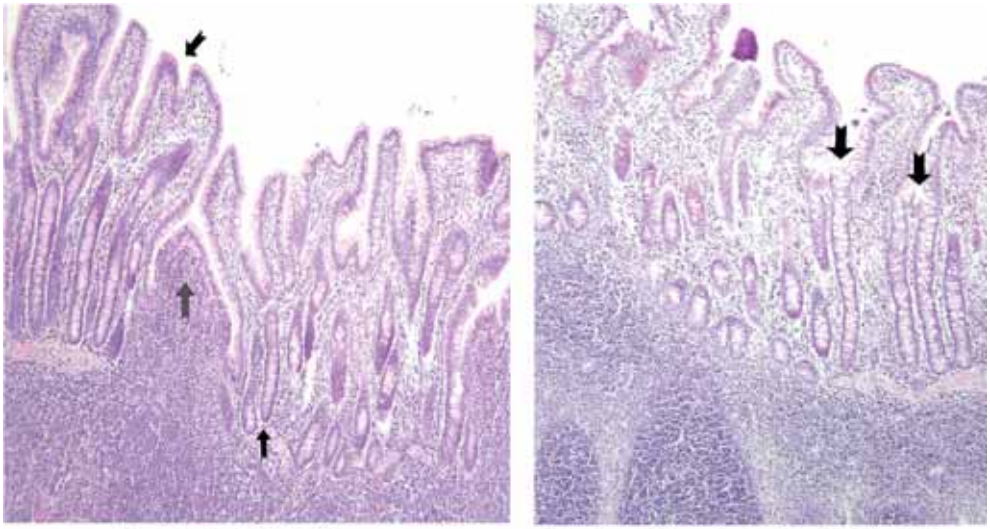
L'impiego degli estratti vegetali nella scrofa in lattazione ha dato risultati contrastanti. La silimarina, componente biologicamente attiva del *Silybum marianum*, costituita da una miscela di flavonolignani e flavonoidi, possiede proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, immunomodulanti e soprattutto esercita un'azione positiva sulle funzioni epatiche, accellerando la biosintesi delle proteine e la rigenerazione cellulare nel tessuto epatico. L'aggiunta di silimarina alla razione delle scrofe in lattazione ha permesso di ottenere un aumento produzione lattea da parte della scrofa a parità di assunzione alimentare e un conseguente aumento dell'incremento ponderale medio dei suinetti durante lo svezzamento (+4%, Cevolani *et al.,* 2008). Un analogo effetto sull'incremento ponderale medio dei suinetti sotto scrofa è stato osservato in seguito all'integrazione della dieta di scrofe in lattazione con miscele di erbe medicinali, quali *Artemisia, Acanthopanax* e Aglio (Kwon *et al.,* 2005).
Non sono stati invece riscontrati effetti sulle performance dei suinetti nella fase sotto scrofa e svezzamento a seguito dell'inclusione di *Echinacea purpurea* nella dieta di scrofe in gestazione e in lattazione (Maass *et al.,* 2005).
Savoini et al. (2002) riportano come la somministrazione di estratti vegetali comporti un aumento della conta leucocitaria totale e differenziale nella fase di post svezzamento.
Benché ci siano evidenze scientifiche che dimostrano l'effetto protettivo di numerosi estratti vegetali, il loro possibile impiego come additivi nell'alimentazione della scrofa e del suinetto richiede un'attenta valutazione del singolo prodotto, in relazione sia alla tipologia di formulazione che all'ottimizzazione della loro inclusione dietetica.

Regolatori del trofismo intestinale

Diverse sostanze di tipo nutraceutico sembrano esercitare rilevanti effetti sullo sviluppo di un corretto metabolismo cellulare a livello enterocitario. L'integrazione delle diete con nucleotidi può comportare una più rapida attività proliferativa degli enterociti, come dimostrato già nel 1990 da Uauy *et al.* A questo riguardo, la somministrazione di alimenti integrati con glutamina (0,5%) e nucleotidi (0,05%) è risultata determinante nel mantenere la conformazione e la funzionalità della barriera mucosale, come evidenziato dall'aumento dell'altezza e della profondità dei villi della mucosa ileale (*figura 2*), dall'aumento dello spessore dello strato mucoso e dal miglioramento dell'attività proliferativa dei macrofagi e dei linfociti intra-epiteliali (Domeneghini *et al.,* 2004).

Del resto, il suinetto riceve nucleotidi e glutamina attraverso il latte e il colostro e la concentrazione di nucleotidi nel latte di scrofa risulta essere relativamente costante durante la lattazione (Mateo *et al.,* 2004), indicando che il loro apporto è fondamentale nelle prime fasi di vita del suinetto.
L'impiego di tali sostanze riveste interesse non solo nel suinetto lattante ma soprattutto nella fase di svezzamento, quando la drastica riduzione di assunzione di alimento influisce negativamente sulle caratteristiche morfometriche della mucosa intestinale, con una progressiva riduzione dell'altezza dei villi, cui si oppone un incremento della proliferazione cellulare a livello di cripte, che porta alla diminuzione del rapporto altezza dei villi/profondità delle cripte e all'aumento del numero di cellule immature.

Figura 2. Effetto della somministrazione di una miscela contenente nucleotidi e glutamina sulle caratteristiche morfologiche dei villi e delle cripte della mucosa intestinale (Domeneghini *et al.,* 2004)



Controllo, 200 x EE **Nucleotidi + glutamina, 200 x EE**

Considerazioni conclusive

Le conoscenze scientifiche hanno evidenziato, nel corso degli anni, un ruolo "funzionale" del latte, al di là delle sue proprietà nutrizionali, grazie alla presenza di diverse componenti bioattive. Tali sostanze hanno dimostrato effetti positivi sulla salute degli animali, suggerendo la realizzazione di nuovi prodotti alimentari "*fit to purpose*", il cui ruolo si differenzia e si integra con quello strettamente nutrizionale dei gruppi alimentari.
Maggiori conoscenze relativamente alla variazione di concentrazione di tali sostanze nel corso della lattazione, le possibili interazioni, la valutazione di un loro impiego come tali o incluse in una matrice lattea, potranno suggerirne un impiego strategico, in funzione dell'età allo svezzamento, caratteristiche delle diete utilizzate, condizioni sanitarie dell'allevamento, al fine sostenere lo sviluppo del sistema immunitario e la salute dell'intestino, dando così una maggiore continuità nel "processo" di svezzamento dei suinetti.

Bibliografia

Baldi A., Pinotti L. 2008. Lipophilic microconstituents of milk. 2008. In: Bösze Ed. Bioactive components of milk: pp. 109-125.

Baldi A., Politis I., Pecorini C., Fusi E., Chronopoulou R., Dell'Orto V., 2005. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. Journal of Daily Research, 72: 66-72.

Bee, G. 2000. Dietary conjugated linoleic acids alter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows. Journal of Nutrition, 130: 2292–2298.

Belurt M.A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annual Review of Nutrition, 22: 505-531.

Bontempo V., Sciannimanico D., Pastorelli G., Rossi R., Rosi F., Corino C. 2004. Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. Journal of Nutrition, 134: 817-824.

Brock J.H. 2002. The physiology of lactoferrin. Biochemistry and Cell Biology, 80: 1-6.

Cevolani D., Arioli E. 2008. L'impiego di silimarina garantisce un latte di qualità. Suinicoltura, 7: 26-29.

Chronopoulou R., Xylouri E., Fegeros K., Politis I. 2006. The effect of two bovine β-casein peptides on various functional properties of porcine macrophages and neutrophils: differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cyclic AMP-1. British Journal of Nutrition, 96: 553-561.

Dionysius D.A., Grieve P.A., Milne J.M. 1993. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic Escherichia coli. Journal of Dairy Science, 76: 2597-2606.

Domeneghini, C., Giancamillo, A. di, Savoini, G., Paratte, R., Bontempo, V., Dell'Orto, V. 2004. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. Histology and Histopathology, 19 (1): 49-58

Feng S., LiLi Z., YongJiu H., GuiJuan L., Tian W. 2006. Effects of casein hydrolysate on the intestinal growth and development in intrauterine growth retardation neonatal piglets. Journal of Nanjing Agricultural University, 29 (3): 59-63.

German J.B. e Dillard C.J. 2006. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46: 57-92.

Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. Journal of Nutrition, 130 (12): 3014-3020.

Griffiths E.A., Duffy L.C., Schanbacher F.L., Dryja D., Leavens A., Neiswander R.L., Qiao H., DiRienzo D., and Ogra P. 2003. In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. Digestive diseases and sciences, 48(7):1324-1332.

Hill H.R. 1987. Biochemical, structural and functional abnormalities of polymorphonuclear leycocytes in the neonate. Pediatric Research, 22: 375-382.

Kunz, C., Rudloff S., Baier W., Klein N., Strobel S.. 2000. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. Annual Review of Nutrition, 20: 699–722.

Kwon O.S., Yoo J.S., Min B.J., Son K.S., Cho J.H., Kim H.J., Chen Y.J., Kim I.H. 2005. Effect of supplemental medicinal plant (Artemisia, Acanthopanax and Garlic) on growth performance and serum characteristic in lactating sows, suckling and weanling pigs. Journal of Animal Science and Technology, 47 (4): 501-512.

Maass N., Bauer J., Paulicks B.R., Böhmer B.M., Roth-Maier D.A. 2005. Efficiency of Echinacea purpurea on performance and immune status in pigs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 89: 244-252.

Matar C., Valdez J.C., Medina M., Rachid M., Perdigon G., 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by Lactobacillus helveticus and its non-proteolitic variant. Journal of Dairy Research, 68: 601-609.

Mateo C.D., Peters D.N., Stein H. H. 2004. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. Journal of Animal Science, 82: 1339–1342.

Meisel H., 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. Current Medicinal Chemistry, 12: 1905-1919.

Molkentin J. 1999. Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk. Nahrung, 43: 185-189.

Newburg, D.S., Pickering, L.K., McCluer, R.H., Cleary T.G. 1990. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Journal of Infectious Diseases, 162: 1075-1080

Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G.M., Morrow, A.L. 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. Annual Review of Nutrition, 25: 37-58.

Nuijens J.H., van Berkel P.H.C., Schanbacher F.L. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. J ournal of Mammary Gland Biololy Neoplasia 1, p. 285–295.

Oram J.D., Reiter B. 1968. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochimica et Biophysica Acta, 170: 351-365.

Pecorini C., Savazzini F., Martino P.A., Fusi E., Fogher C., Baldi A. 2005. Heterologous ex-

pression of biologically ctive porcine lactoferrin in Pichia pastoris yeast. Veterinary Research Communications, 29 (Suppl. 2): 379-382.

Pettigrew, J.E., Harmon B.G. 1977a. Milk proteins for artificially reared piglets. I Comparison to egg white protein and effect of added immunoglobulins. Journal of Animal Science, 44: 374-382.

Pettigrew, J.E., Harmon B.G., Simon J., Baker D. H. 1977b. Milk proteins for artificially reared piglets. II Comparison to a skim milk hydrolysate. Journal of Animal Science, 44: 383-388.

Pettigrew, J.E., Harmon B.G., Curtis S. E., Cornelius S. G., Norton H. W., Jensen A. H. 1977c. Milk proteins for artificially reared piglets. III. Efficacy of sodium caseinate and sweet dried whey. Journal of Animal Science, 45:261-268.

Politis I., Chronopoulou R. 2008. Milk peptides and immune response in the neonate. In: Bösze Ed. Bioactive components of milk: pp. 253-269.

Savoini G., Bontempo V., Cheli F., Baldi A., Sala V., Mancin G., Agazzi A., Dell'Orto V. 2002. The Veterinary Record, 151: 577-580.

Séverin S., Wenshui X., 2005. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 645–656.

Tao N., DePeters E. J., Freeman S., German J. B., Grimm R., and Lebrilla C. B. 2008. Bovine Milk Glycome. Journal of Dairy Science, 91: 3768–3778.

Teraguchi S., Shin K., Ozawa K., Nakamura S., Fukuwatari Y., Tsuyuri S., Namihira H., Shimanura S. 1995. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of Clostridium species in the gut of mice fed bovine milk. Applied and Environmental Microbiology, 61: 501-506.

Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R. 1990. Effect of dietary nucleotides on growth and maturation on the developing gut in the rat. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 10: 497-503.

Van Leeuwen P., Oosting S.J., Mouwen J., Verstegen M.W.A. 2000. Effects of a lactoperoxidase system and lactoferrin, added to a milk replacer diet, on severity of diarrhoea, intestinal morphology and microbiology of digesta and faeces in young calves. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 83: 15-23.

Veh, R.W., Michalski J.C., Corfield A.P., Sander-Wewer M., Gies D., Schauer R.. 1981. New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides. Journal of Chromatography A, 212: 313–322.

YongJiu H., Tian W., LiLi Z., Feng S., GuoBin C. 2006. Effect of pre-hydrolyzed casein on the development of gastrointestinal tract in neonatal pigs. Journal of Yangzhou University, Agricultural and Life Sciences 27, 4: 47-50.

ENTERITI NEONATALI ENZOOTICHE DEI SUINETTI LATTANTI, CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLE CLOSTRIDIOSI

A.D. NIGRELLI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER

Key words: enteric disease, clostridia, ETEC

Parole chiavi: patologia enterica, clostridi, ETEC

Summary. Etiology, pathogenesis, lesions, syntoms, prophylaxis and management factors of the enzootic enteritis in the suckling piglets are considered.

Riassunto. Vengono trattati gli aspetti eziologici, patogenetici, clinici, anatomo patologici e profilattici delle enteriti enzootiche dei suinetti lattanti ed i fattori gestionali che possono condizionare tale patologia.

Nonostante l'introduzione di programmi di profilassi, l'utilizzo di vaccini tecnologicamente avanzati, di antibiotici sempre più mirati e la messa a punto di strategie alimentari innovative nelle scrofe, le diarree dei suinetti lattanti restano uno dei problemi economicamente importanti dell'allevamento suino.
Possiamo distinguere due forme di diarree neonatali, per gli aspetti epidemiologici che, però, si riflettono automaticamente nelle strategie di controllo.

DIARREE DEI LATTANTI A CARATTERE EPIDEMICO

Fondamentalmente sono le enteriti da Coronavirus: PED e TGE (anche se, in passato, abbiamo visto decorrere questa malattia in forma enzootica). La TGE non è più osservata da molto tempo, probabilmente per il livello immunitario determinato dalla diffusione, nei suini italiani ed europei, della variante respiratoria PRCV che ha conferito una protezione crociata nei confronti della TGE.
La PED, assente per molti anni dal nostro Paese ha causato tra il 2005 ed il 2006 una grave epidemia che ha colpito moltissimi allevamenti del Nord Italia, grazie alla notevole resistenza del virus, favorita anche dalle basse temperature del periodo, dallo scarso livello di biosicurezza della suinicultura italiana (allevamenti e trasporti) e dall'assenza nella popolazione suina, di immunità specifica.
L'epidemia decorse con elevata morbilità e mortalità, che, negli allevamenti da riproduzione, colpivano tutti i settori con diarrea, iperemia e iporessia a macchia di leopardo nelle scrofe gestanti: anoressia e agalassia nelle scrofe allattanti; diarree e deperimento nei suinetti sottoscrofa con perdite fino a 20 – 25%, in funzione del livello di adeguatezza delle terapie reidratanti praticate e dalla precocità di svezzamento. La durata della malattia, tendenzialmente lenta negli allevamenti a ciclo chiuso, veniva ridotta mediante la somministrazione di feci di suinetti in diarrea alle scrofe gestanti: in tal modo si riducevano anche le perdite dei suinetti.

DIARREE DEI LATTANTI A CARATTERE ENZOOTICO

Rappresentano l'aspetto economicamente più importante della patologia enterica dei suinetti lattanti, per il perdurare nel tempo in una stessa unità produttiva e per le difficoltà di controllo che si incontrano, poiché l'eziologia infettiva è fortemente condizionata da fattori gestionali e/o strutturali.

1. ASPETTI EZIOPATOGENETICI DELLE DIARREE ENZOOTICHE DEI LATTANTI

Gli agenti infettivi, variamente associati, sono rappresentati da:
E. coli enterotossici – ETEC
Clostridium perfringens di tipo A o C (più raramente)
Clostridium difficile
Coccici (Isospora suis)
Rotavirus

Nelle tabelle 1, 2, 3, è riportata la prevalenza dei vari agenti e le loro associazioni.
L'eziopatogenesi prevede l'infezione, la moltiplicazione a livello intestinale e lo sviluppo clinico della malattia.

CARICA INFETTANTE

L'intestino del suinetto alla nascita è sterile e viene facilmente colonizzato dalla flora batterica presente nell'ambiente (cute della scrofa, gabbia parto): il pH gastrico alla nascita è vicino alla neutralità.
La flora batterica dell'ambiente è quindi quella che deriva dalle feci della madre.
Il profilo microbiologico della flora intestinale della scrofa è influenzato da:

- . dal tipo di alimentazione (livello e qualità delle fibre e degli amidi) nelle fasi di gestazione, lattazione e preparto
- . dall'accumulo di gas intestinali
- . dalla presenza o meno di siti di adesione per le adesive di batteri (es. E. coli K88), che ne facilitano la moltiplicazione
- . dalla qualità igienica dell'acqua e dell'alimento.
- . dall'attività di peristalsi intestinale (vicino al parto è rallentata per lo stress del cambio di ambiente ed i cambiamenti ormonali)

Tutto questo può portare, nell'intestino delle scrofe, ad un aumento di flora batterica potenzialmente patogena (E.coli e Clostrid)i: alcuni ceppi sono molto patogeni, altri meno patogeni e altri ancora non patogeni.

PATOGENICITA' DEGLI AGENTI COINVOLTI

La capacità di moltiplicazione a livello intestinale è legata alla presenza di fattori adesivi (soprattutto per E. coli enterotossici) e la capacità di produrre tossine che provoca la sintomatologia enterica non sono uguali in tutti i ceppi.
Un ceppo di E. coli che produce solo ST (tossine termostabili) è enterotossico meno patogeno di un ceppo E. coli enterotossico che produce LT (tossine termolabili) o entrambe le tossine. La capacità di colonizzazione dei ceppi di E. coli dotati dell'adesina K88 è maggiore di quelli dotati di altre adesivi (es. F 41). I ceppi di E. coli in grado di produrre enterotossine con mortalità improvvisa verso la fine della

lattazione, anche se poco frequente, sono dotati di adesiva F18.
Alcuni ceppi di Clostridium perfringens tipo A producono solo tossina Alfa, altri, più patogeni, tossine Alfa + Beta2.
Il Costridium perfringens tipo C produce la tossina Beta molto patogena che dà un quadro molto grave.
Il Clostridium difficile può produrre entrambe le tossine A e B, una sola o nessuna (non patogeno): e' fondamentale, nella diagnostica, identificare i ceppi coinvolti anche per questo aspetto.

DIFESA IMMUNITARIA
La moltiplicazione degli agenti infettivi a livello intestinale è contrastato dal sistema immunitario, la cui efficacia è condizionata da:

. stato di primipara delle madri e del condizionamento avuto prima del parto
. ipogolassia post-partum (PHS) che deprime la produzione di colostro e latte e quindi l'assunzione di anticorpi o stati di deficit nutrizionale (ipoglicemia) dei neonati.
. atteggiamento di scarsa disponibilità della scrofa all'allattamento per la produzione di gas con conseguente decubito anomalo e le conseguenze descritte precedentemente
. dimensione delle nidiate: peso, omogeneità e vitalità alla nascita, durata del parto, efficienza del baliaggio (che comporta anche rischio di diffusione delle diarree); fattori che da un lato deprimono l'assunzione del colostro e del latte e creano un circolo causa-effetto negativo nella stimolazione delle mammelle per scarsa suzione
. infezioni, contratte in gestazione dei suinetti, da virus con capacità immunodepressiva (PRRS, PCVII)
. inattivazione dell'immunità mucosale da agenti infettivi concomitanti (es. Rotavirus)
. abbassamento fisiologico della quantità di anticorpi passivi presenti nel latte dopo la prima settimana.

GESTIONE DELLA SALA PARTO
L'adeguatezza del nido, le temperature troppo elevate della sala parto, la gestione igienica della sala e gabbia parto e la presenza di movimenti di aria troppo veloci sotto le gabbie hanno influenze significative sulle patologie enteriche neonatali.

2. <u>ASPETTI DIAGNOSTICI DELLE ENTERITI ENZOOTICHE</u>
Il punto critico è il campione: feci o intestino. E' fondamentale associare i batteri coinvolti, ancorché con caratteristiche di patogenicità ad una carica per grammo di contenuto intestinale o di feci per poter emettere una diagnosi, poiché la sola presenza di E. coli enterotossici o Clostridium perfringens non è sufficiente. La moltiplicazione di tali batteri avviene anche dopo la morte. I campioni devono essere esaminati non oltre le 6 – 8 ore dalla morte o dal prelievo, durante le quali vanno refrigerati, per evitare falsi positivi. Inoltre campioni mal conservati e non prelevati all'inizio della patologia possono dare fasi negativi per l'inattivazione delle tossine, se labili come nel caso di Costridium difficile.

Diagnosi di enterite da E. coli enterotossici/Clostridium perfringens tipo A:

carica batterica su a.sangue incubato in aerobiosi ed anaerobiosi.

a) Sviluppo di colonie riferibili a E.coli su agar sangue in aerobiosi e anerobiosi, emolitiche o no, almeno 1x106 :
sospetta Colibacillosi da confermare con verifica della presenza di caratteristi che di patogenicità con PCR
multiplex per tossine ST, LT e adesine F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p) F7 (F41) o F18.
La presenza di una o più di queste caratteristiche ci porta ad emettere una diagnosi.

b) Sviluppo di colonie riferibili a Clostridium perfringens, sviluppata solo in anaerobiosi, (Foto 1) in quantità di almeno 5x105: probabile Clostridiosi che viene confermata dalla genotipizzazione mediante PCR multiplex Alfa
o Alfa + Beta2.
Nel caso di Clostridium perfringens tipo C, vista la tipicità del quadro anatomo-clinico è sufficiente l'isolamento senza la determinazione quantitativa (solitamente è una coltura pura).

La diagnosi di diarree da Clostridium difficile viene effettuata con test ELISA che ricerca direttamente le tossine A e B, anche se è opportuno associare la ricerca microbiologica ancorché qualitativa al fine di una migliore valutazione diagnostica, vista la labilità della tossina: le colonie sono caratteristiche nel colore e nell'odore.
Un cenno alla diagnosi per Rotavirus, fattibile con PCR, Elisa ed IF: la PCR è troppo sensibile meglio IF o Elisa che ci fornisce indicazioni anche semiquantitative, utili vista la diffusione del virus nei suini.

3. ASPETTI CLINICI ED ANATOMOPATOLOGICI DELLE DIARREE DA CLOSTRIDI: PROBLEMA INFETTIVO?

Non ci soffermiamo sulle diarree da E.coli enterotossici, fin troppo note, ma sulle enteriti da Clostridi, batteri che possono produrre spore, che conferiscono loro carattere di resistenza e causano enterite mediante la produzione di tossine:
Clostridium perfringens di tipo A
Clostridium perfringens di tipo C
Clostridium difficile
Clostridium perfringens è classificato in tossinotipi per infezione delle tossine prodotte (Tavola 4).

CLOSTRIDIOSI DA CL. PERFRINGENS TIPO C

Decorre nella prima settimana di vita con forme acute, che colpiscono tutte le nidiate, caratterizzate da diarrea sanguinolenta con frustoli necrotici, enterite-necrotico emorragica e morte rapida (Foto 2, 3) oppure in forma cronica con deperimento e morte più lenta: la Tossina Beta è la causa della patologia. Si presenta in forma primaria è poco frequente, associata, a volte, a scarsa igiene dell'acqua e dell'alimento ed è di facile diagnosi clinica e necroscopica.

CLOSTRIDIOSI DA CL. PERFRINGENS TIPO A

Difficile da diagnosticare sia clinicamente sia con esame necroscopico, si presenta tra la prima e la terza settimana con feci pastose che imbrattano il perineo, deperimento, distensione del piccolo intestino, atrofia dei villi intestinali, assenza di sangue e presenza seppure rara di aree necrotiche il tutto causato dalle tossine Alfa (16% degli isolati) e Alfa + B2 (84% degli isolati).

CLOSTRIDIOSI DA CL. DIFFICILE

Colpisce, cavallo, cane, animali da laboratorio e l'uomo, in cui è associata ad eccesso di antibiotico terapia, e nel quale causa forme morbose gravi (colite pseudomembranosa, megacolon tossico, setticemia, mionecrosi).
L'attività patogena è esplicata da una tossina A (enterossica, che aumenta la quantità di liquido intestinale) e la tossina B (citotossica che provoca atrofia dei villi intestinali).
Decorre con diarrea gialla o gialloscuro nella prima/seconda settimana di vita; in alcuni casi con poca diarrea e deperimento. Il quadro anatomo-patologico è caratterizzato da enterocolite ed edema al mesocolon (Foto 4) patognomonico, ma incostante. L'aumento dell'incidenza delle diarree da Clostridi, (è opportuno ricordare che vengono ricercate con una certa accuratezza solo da alcuni anni) e la considerazione che non sempre in un allevamento si isola sempre lo stesso microrganismo (a volte Cl. Perfringens, a volte Cl. Difficile, a volte ETEC) ha fatto ipotizzare (Martineau et al., 2005) che si tratti di diarree funzionali che trovano l'inizio del processo morboso nell'utilizzo eccessivo degli antibiotici. In effetti le ripetute iniezioni di antibiotici ai suinetti sottoscrofa e l'aumentata pressione metafilattica negli allevamenti per contrastare le forme di PRDC potrebbe portare la riduzione il numero di batteri (lattici) presenti nel colon che a sua volta porta ad una riduzione delle degradazioni dei carboidrati (con conseguente malassorbimento) quindi una minor produzione di acido lattico e acidi grassi a catena corta (citrico, butirrico, acetico, propionico), che sono fonte energetica per i colonociti. Solo alla fine i Clostridi, che possono resistere agli antibiotici meglio di altri batteri (tramite la sporulazione), aggravano il quadro.

LINEE DI PROFILASSI DELLE DIARREE ENZOOTICHE DEI SUINI LATTANTI

Gli aspetti che riteniamo importanti sono rappresentati da:

- Alimentazione della scrofa gestante, nel preparto e in lattazione con livelli adeguati e tipologia di fibra adeguati, favorendo il transito intestinale nel preparto con possibilità di modulazione della flora intestinale favorevole allo sviluppo di sviluppo di lattobacilli e pedococchi.
- Igiene della gabbia parto (vuoto totale, disinfezione): specialmente i Clostridi resistono a lungo.
- Temperature ottimali di 20° C dell'ambiente parto.
- Considerare la capacità gestionale dell'allevatore prima di scegliere scrofe molto prolifiche.
- Condizionamento delle primipare per i patogeni enterici (vaccini, feci delle pluripare)
- Immunizzazione di tutto il parco scrofe nei confronti del problema (Clostridium perfringens o E.coli): i tossoidi sono efficaci per quanto riguarda il Clostridium perfringens.
  A questo riguardo alcune prove di campo effettuate in un allevamento a bande hanno visto ridurre le diarree nelle bande vaccinate in modo significativo,

poco significativa, invece, la differenza nelle perdite anche se la presenza di un problema di ipogolassia post-partum rendeva difficile la valutazione della specificità della mortalità.

Per quanto riguarda la profilassi vaccinale delle diarree da ETEC è fondamentale verificare in laboratorio se il tipo di adesione o tossine coinvolte è contenuto nel vaccino in alternativa sono possibili prodotti stabulogeni.

. Cercare di stabilizzare la scrofaia verso la PRRS per evitare i nati infetti e ipogolassia da PRRS e immunizzare il parco scrofe verso PCVII

. Metafilassi antibiotica a scrofe e suinetti: mirando la scelta dell'antibiotico abbiamo ottenuto risultati interessanti anche nel caso di Cl. Difficile, il che contrasta con l'ipotesi "noso comiale".

PREVALENZA DI AGENTI PATOGENI IN ENTERITI DI SUINETTI LATTANTI

Dati IZSLER Sezione di Mantova, percentuali 2004 - 2005

Tabella 1

	% dei casi
E. coli enterotossici	36%
Cl. perfringens tipo A/A+ß2	49%
Cl. perfringens tipo C	0,3%
Cl. difficile (microbiologico)	41%
Cl. difficile (tossine A/B)	28,2%
Rotavirus	23%
Coccidi	8%

PREVALENZA DI C. PERFRINGENS DI ENTERITE IN SUINETTI LATTANTI

Tabella 2

	% sul totale isolamenti
C. perfringens Tipo C	3%
C. perfringens Tipo A/A+B2 + ETEC	15%
C. perfringens tipo A/ A+β2 + C. *difficile*	18%
C. perfringens tipo A+β2+ *Rotavirus*	12%
C. perfringens tipo A+β2 + C. *difficile* + ETEC	27%
C. perfringens Tipo A+β2	25%
Totale campioni	100%

ASSOCIAZIONI DI C. *difficile* IN ENTERITI DI SUINETTI LATTANTI

Tabella 3

	% sul totale isolamenti
C. difficile	25%
C. difficile+ *ETEC*	25%
C. difficile + *C. perfringens* tipo A/A+β2	18%
C. difficile + *C. perfringens tipo* A/β2 + ETEC	27%
C. difficile + Rotavirus	5%
Totale campioni	100%

TOSSINOTIPI E C. PERFRINGENS

Tabella 4

	TOSSINE					
Tipo	**alfa**	**beta**	**epsilon**	**iota**	**beta2**	**Enterotossina****
A	++*				+*	
B	+	++	+			
C	(+)	++				
D	+		++			
E	+			++		

* associate
* * tipica delle tossinfezioni umane

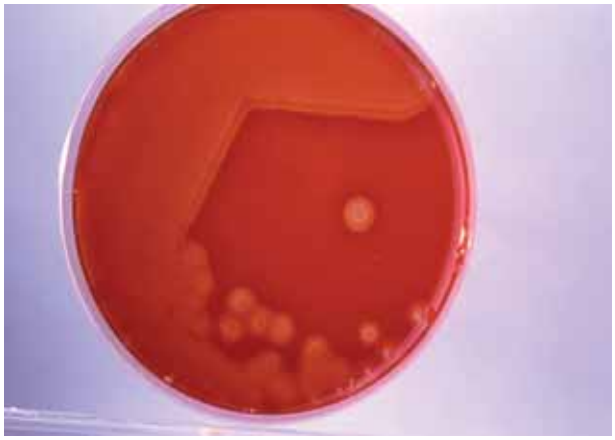


Foto 1: *Cl. perfringens di tipo A*

Foto 2: *Enterite necrotico emorragica da Cl. Perfringens tipo C*

Foto 3: *Enterite necrotico emorragica di Cl. Perfringens tipo C*

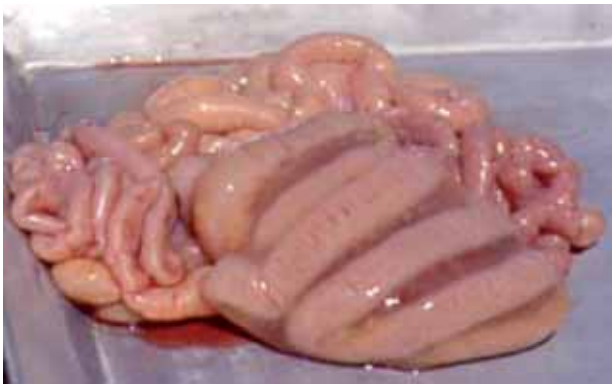


Foto 4: *Edema al mesocolon da Cl. difficile.*

MALATTIE ASSOCIATE A PCV2

Sorridete !

La redditività è stata ripristinata.

Merial ha creato il primo e unico vaccino contro il PCV2
che induce una efficace protezione dei suini fin dalla nascita.

Il vaccino Merial contro il PCV2 ha raggiunto risultati di campo ineguagliati,
riducendo i sintomi clinici e la mortalità da PCV2 e migliorando
quindi le performance produttive dalla nascita al macello.

Il vaccino Merial contro il PCV2 ripristina la redditività.

vaccino Merial
contro il PCV2

Chiedi al Tuo Veterinario.

PROTEGGE. SEMPLICEMENTE.

Merial Italia spa - Centro Direzionale Milanofiori - Strada 6, Palazzo E/5 - 20090 Assago (MI)
Tel. 02.57.76.61 - Fax 02.57.766.301 - E-mail: merial.italia@merial.com - www.merial.com

© Copyright 2007. Tutti i diritti riservati.

MERIAL

MALATTIE PUERPERALI, PERINATALI E SINDROMI DISGALATTICHE DELLA SCROFA

CANDOTTI PAOLO (*), ROTA NODARI SARA (*)

(*) Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Via Bianchi 9
email: paolo.candotti@bs.izs.it, sara.rotanodari@bs.izs.it

INTRODUZIONE

L'allontanamento della scrofa (riforma) avviene a causa di un numero non elevato di cause: problemi riproduttivi (30-60%), anzianità (20-40%), problemi locomotori (5-15%) ed altre cause (5-10%) di minore entità (scarsa attitudine materna, valore genetico, patologie infettive "minori", incidenti, ecc.).
La sostituzione dei riproduttori è determinata all'allontanamento volontario di alcuni soggetti, dal rimpiazzo di quelli soppressi per ragioni di *humanitas* e di quelli deceduti spontaneamente. Per quanto riguarda questo ultimo fattore, numerosi Autori concordano nell'identificare proprio la sala parto come il punto a maggior rischio, ovvero quel reparto aziendale ove si verifica la maggiore perdita di scrofe per decesso spontaneo. Secondo fonti statunitensi (22) il numero dei decessi tra i riproduttori femmina è aumentato per cause ancora da chiarire, e il 50% di questi avviene tra il breve periodo pre-parto e i primi 21 giorni di lattazione. Dello stesso avviso Duran C.C. (26) che sostiene che il 55 per cento di tutti i decessi avvengono nelle 4-5 settimane comprese tra il parto e lo svezzamento e che per il 72,5% dei decessi l'allevatore non riferisce altro che una morte improvvisa. Anche Chagnon M. (17) individua una mortalità delle scrofe più elevata in questa fase, ed in particolare del 42,1% nel *peripartum* (da 3 giorni prima del parto a 3 giorni dopo il parto) e del 16.5% durante la lattazione (da 3 giorni dopo il parto allo svezzamento). Di particolare interesse è la ricerca retrospettiva di Deen J. (23), Università del Minnesota, che ha analizzato statisticamente 3,6 milioni di dati riproduttivi aziendali statunitensi tra il 1996 ed il 1998. Da tale studio è emerso che, sebbene la mortalità delle scrofe appaia in aumento, non sembra avere specifiche caratteristiche riconducibili ad un preciso agente eziologico. Sono identificabili, però, dei fattori di rischio associati alla mortalità ed in particolare il parto (grafico 1), associato ad altri effetti come l'età alla prima copertura, la stagione (grafico 2) e le condizioni al momento del parto. Questi fattori combinati suggerirebbero un'incapacità di queste scrofe di condurre la lattazione ed avere un'elevata probabilità di sopravvivenza. Nel grafico 3 è possibile inoltre osservare la distribuzione di mortalità nelle diverse classi di parto.

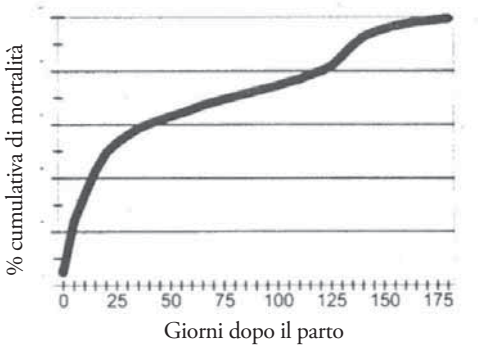


Grafico 1. Perdita cumulativa di scrofe misurata a partire dal giorno del parto (Deen J. 1999 modificato, 22).

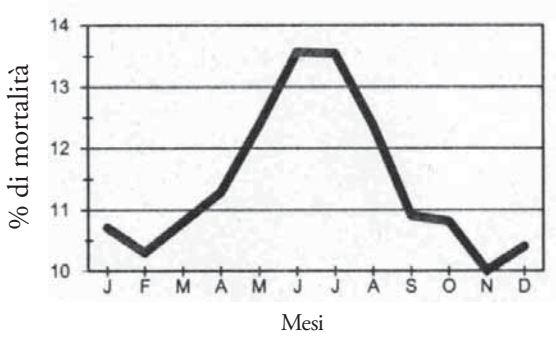


Grafico 2. Andamento stagionale della mortalità (Deen J. 1999, modificato, 22).

Grafico 3. Mortalità suddivisa per classi di parto delle scrofe (Deen J. 1999, modificato, 22).

All'interno delle così dette problematiche riproduttive esiste una categoria di queste che ha origine all'interno della sala parto e che esordisce con disturbi puerperali (clinici o sub clinici) con potenziali effetti devastanti sulla carriera dell'animale. Alcune di queste sindromi sono ben note (mastite, MMA, VDS), ma sottovalutate anche per l'avvento della PRRS che in molti casi è responsabile di quadri clinici assai simili a quelli sostenuti dalle patologie puerperali classiche.
L'obiettivo di questa rassegna è di identificare le patologie perinatali e puerperali della scrofa, di esaminarne i punti di rischio e di procedere alla trattazione degli elementi di profilassi e terapia.

TRAUMI

Lesioni agli arti ed alle mammelle

Boyle L.A. et al. (12), in uno studio condotto in 25 allevamenti, ha individuato che le scrofe in lattazione ed in attesa calore mostravano una quantità di lesioni statisticamente più elevata delle scrofe in gestazione, ed in particolare, le scrofe con BCS (*body condition score*) inferiore a 3 mostravano lesioni maggiori rispetto a quelle con condizione corporea superiore; inoltre, le scrofe più vecchie mostravano lesioni maggiori rispetto alle più giovani. In particolare, la lesione più frequente era allo sperone laterale (20.5%

delle scrofe lattanti colpite e 14,7% delle scrofe in attesa calore), seguita dalla lesione alla spalla (14.5% delle scrofe lattanti colpite e 6.8% delle scrofe in attesa calore).
Interessante ed articolato il protocollo di Quemere P. e coll. (62) che ha previsto la somministrazione di una scheda a punteggiatura per la valutazione delle lesioni delle scrofe a vari apparati in relazione alla pavimentazione. In particolare, per la scrofa lattante sono stati valutati tre tipi di suolo (fessurato in calcestruzzo, grigliato metallico e pavimento pieno con paglia) e due tipi di contenzione (collare e gabbia). Paragonando il fessurato in cemento con il grigliato metallico "tondino" i risultati sono stati i seguenti:

- il grigliato in metallo "tondino" è più sfavorevole rispetto a quello di cemento in termine di nati mortalità e anoressia delle scrofe (malgrado un inferiore tasso di scrofe ipertermiche),
- il fessurato in cemento è nettamente svantaggioso in quanto la mortalità dei suinetti è stata molto superiore, così come l'incidenza di *splay leg* e di diarrea (quasi doppia).

In una successiva fase è stato paragonato il grigliato metallico ("piattino") con il fessurato in cemento e il pavimento pieno con paglia: quest'ultimo pavimento si è rivelato il maggiormente confortevole per i suinetti e, non di secondaria importanza, la frequenza di scrofe con temperatura superiore a 39,8°C era significativamente ridotta.
Gli Autori hanno notato che la frequenza di lesioni alle mammelle, ai capezzoli e soprattutto alle spalle era significativamente superiore nelle scrofe legate rispetto a quelle solo contenute.
Di un certo rilievo è il dato che tutte le scrofe che avevano albergato per almeno 3 mesi su grigliato di cemento avevano almeno una lesione; all'entrata in sala parto la lesione più frequente era alle unghie, in particolare la superficie a contatto con il suolo:

- 89% delle scrofe con lesioni ai talloni,
- 70% delle scrofe con fessurazioni della muraglia,
- 41% delle scrofe con lesioni da usura,
- 10 % delle scrofe con distacco dell'unghia,
- 10% delle scrofe con pododermatite.

Il 56% delle scrofe esaminate presentava lesioni all'articolazione metatarso-falangea ed il 49% agli unghielli accessori (fino al 12% con avulsione).
All'uscita dalla gabbia parto, mentre le lesioni agli arti diminuivano, aumentavano le lesioni alle mammelle ed ai capezzoli: dal 14 al 24% di lesioni benigne, dal 2 a 14% di lesioni gravi alle mammelle, dal 6 al 21% di lesioni benigne ai capezzoli ed infine dallo 0 al 10% di lesioni gravi ai capezzoli.
Con l'aumentare del numero dei parti della scrofa aumentava la frequenza delle lesioni (raddoppiava tra il primo ed il settimo parto), mentre era poco significativa la variazione dell'entità delle lesioni.
Ancora riguardo all'influenza del tipo di pavimentazione in gabbia parto, Edwards S.A. (27) ha mostrato come le scrofe alloggiate su pavimentazione piena arricchita con paglia mostrano meno lesioni sia rispetto alle scrofe stabulate su pavimento totalmente fessurato (in metallo o rivestito in plastica) sia rispetto alle scrofe alloggiate su pavimentazione piena in cemento parzialmente fessurata (in metallo o rivestito in plastica). Le lesioni agli arti, ma non quelle ai capezzoli, sono inferiori sulle pavimentazioni parzialmente fessurate rispetto alle totalmente fessurate. In entrambe le pavimentazioni (parzialmente o totalmente fessurate) l'incidenza delle lesioni ai capezzoli ed agli arti è maggiore sulle pavimentazioni in metallo rivestito di plastica rispetto a quelle in metallo. La lesione

agli arti più frequentemente riscontrata è a carico dell'arto posteriore, alla base del dito accessorio. Nella maggior parte dei casi si tratta semplicemente di una abrasione della cute che, però, nel caso di una pavimentazione in metallo rivestita in plastica si estende anche al ginocchio, interessa un numero maggiore di animali, ed in alcuni casi è più grave (gonfiori ed ampie ferite).
Nello stesso lavoro Edwards S.A. riporta i risultati delle osservazioni cliniche prima del parto ed allo svezzamento distinte per paio di mammelle (tab.2); il quinto, il sesto ed il settimo paio di mammelle risultano i più danneggiati: le lesioni riscontrate sono tagli verticali ed orizzontali, abrasioni, ed in pochi casi l'ablazione completa del capezzolo.

Tabella 1: localizzazione delle lesioni ai capezzoli prima del parto ed allo svezzamento.

paio di mammelle	percentuale di lesioni	
	al parto	allo svezzamento
1	0	1
2	0	0
3	0	1
4	4	10
5	20	32
6	38	32
7	31	19
8	7	5

Bonde M.K. et al (11), in accordo con Lewis E. et al. (52) evidenzia che il tipo di pavimentazione influenza la possibilità di scivolare della scrofa ed i suoi tentativi di assumere la posizione sdraiata, nonché le lesioni cutanee. Mentre, però, Boyle L.A. et al. (13) osservano un'associazione tra gli elevati tentativi messi in atto dalla scrofa prima di riuscire a sdraiarsi nei primi giorni di presenza nella gabbia parto, e la presenza di lesioni carpali, questo non viene osservato da Bonde M.K. et al (11) che evidenzia un'associazione tra ulcere e scarse condizioni corporee e tra ulcere e zoppia. Questi risultati sono in accordo con quelli di Davies P.R. et al. (21) che, inoltre, rileva un aumento delle ulcere cutanee con l'aumentare del numero di parti delle scrofe, a causa dell'aumento del peso corporeo ed una minore attività o possibilità di movimento da parte delle scrofe di corporatura più grossa. Sempre Bonde M.K. et al (11) evidenzia una associazione tra zoppia e ferite al piede ed al ginocchio posteriore, probabilmente causate dal maggiore decubito e dalla maggiore possibilità di scivolare durante lo sdraiarsi. La scivolosità dei pavimenti come causa determinante l'insorgenza delle lesioni agli arti è stata riportata anche da Lewis E. et al. (52) e Edwards S.A. (27) che hanno anche indicato la scivolosità dei pavimenti piuttosto che la loro abrasività come possibile causa anche di danni alla mammella.
Abbiamo già parlato del conflitto tra scrofa e suinetti durante la lattazione e della costante sottomissione della scrofa ai fabbisogni della nidiata nell'impotenza di una fuga.
Oltre al dimagramento per un eccessivo depauperamento delle riserve organiche, dobbiamo menzionare le malattie che l'apparato mammario può manifestare per azione diretta dei suinetti.
La cute della regione mammaria della scrofa allevata è assai più sottile e delicata di quella

di una scrofa allo strato brado, per effetto della mancata sollecitazione con terra, sterpi, ecc.; al contrario, il costante contatto con pavimentazioni non abrasive, la contenzione, l'umidità hanno fatto sì che la resistenza della cute agli insulti dei suinetti sia notevolmente diminuita.
Dobbiamo quindi ricordare che, nel tentativo di succhiare latte e di favorire la montata lattea, il suinetto massaggia con la testa, morde con i denti, calpesta, nel tentativo di accaparrarsi la mammella più produttiva, infierendo con tutti i mezzi di cui è dotato: il risultato, non raramente, è la creazione di abrasioni, piccoli tagli che si infettano con enorme facilità provocando infiammazioni di tipo settico (foruncolosi, dermatiti, ecc.). La stafilococcosi mammaria cutanea è l'espressione più grave determinando gravi dermatiti purulente in grado di estendersi anche ai tessuti sottocutanei e ghiandolari con il risultato di processi necrotico gangrenosi.

Ulcera a livello della tuberosità scapolare

Per quanto riguarda le ulcere da decubito a livello della scapola, Boyle L.A. et al. (13) ne rilevano un numero maggiore nelle scrofe lattanti rispetto a quelle svezzate. Il decubito prolungato, insieme con le scarse condizioni corporee vengono indicati come possibili cause scatenanti. Tuttavia, Davies P.R. (21) sostiene che la stabulazione di scrofe su pavimenti "duri" è una condizione necessaria ma non sufficiente allo sviluppo di piaghe da decubito, e le scarse condizioni corporee non possono essere ritenute il fattore più importante in allevamenti ben condotti.
Il riscontro maggiore delle ulcere in estate ha fatto ipotizzare a Davies P.R. (20) che l'umidità cutanea causata dai gocciolatori individuali, ove utilizzati, ne sia la causa. Questa ipotesi è suffragata dal parallelismo con la specie umana dove i fattori primari nello sviluppo delle piaghe da decubito sono la compressione fisica esterna, forze taglienti e sfregamenti, ma molti altri secondari ne contribuiscono alla comparsa: immobilità, malattie immobilizzanti, infezione elevata temperatura corporea, farmaci, malattia acuta, età, nutrizione, qualità del giaciglio e posizione, umidità. In effetti, la scrofa al parto presenta numerosi di questi fattori predisponenti: durante il parto il 50% delle scrofe giace sdraiata continuamente su un solo lato e, comunque, durante la prima settimana di lattazione si alza con minore frequenza e per periodi più brevi rispetto alle settimane successive; inoltre, la temperatura corporea delle scrofe, è in genere, di 1-2°C più elevata durante il parto, fase in cui è anche più probabile che l'animale manifesti febbre (19).

Lesioni alla testa

La gabbia parto, impedendo l'espressione del normale comportamento di costruzione del nido della scrofa, può portare ad elevati segni di stress, e ciò può essere evidenziato dal comportamento dell'animale (9, 64). Il battere con le zampe, il grufolare ed i comportamenti nasali aumentano nelle 24 ore *pre-partum* (70, 73) e si ritiene possano contribuire alle lacerazioni, contusioni, abrasioni frequentemente osservate nelle scrofe in gabbia parto (45). Nelle scrofe in gestazione la maggior parte delle lesioni al capo sono nella regione del naso e probabilmente sono il risultato delle interazioni tra la scrofa e la mangiatoia, nel tentativo di ottenere cibo dalle mangiatoie vicine, piuttosto che dal rapporto tra le dimensioni della scrofa e della gabbia (1). Anche nelle scrofe in sala parto si rilevano frequentemente interazioni tra la scrofa e la mangiatoia, dove il comportamento della scrofa sembra finalizzato ad ottenere alimento. Sebbene questo comportamento in parte spieghi le lesioni localizzate agli arti anteriori ed alla regione della testa,

le osservazioni personali attribuiscono la maggior parte delle lesioni nella regione del capo a specifiche strutture della gabbia (abbeveratoio, mangiatoia, barriere contenitive) che, per caratteristiche intrinseche (abrasività, margini taglienti, mancato rispetto della biometria) o per errato posizionamento, determinano lesioni. Tale affermazione è suffragata anche dal riscontro di lesioni con localizzazione specifica e tipica per azienda, il che suggerisce, appunto, che più che uno specifico comportamento, sia una specifica struttura ad indurre la lesione.
Merita poi un discorso a parte l'autolesionismo della scrofa in corso di ectoparassitosi che, nella gabbia parto, può esprimersi con gravi lesioni di tipo localizzato a causa dell'impossibilità della scrofa di avvalersi di "grattatoi" meno traumatici (muri, ecc.). In questo caso, le lesioni sono localizzate sulla fronte, sulla schiena e sul collo e possono assumere l'entità di vere e proprie ferite sanguinanti.

Lesioni alla vulva
La già delicata regione vulvare, diviene assai più vulnerabile nelle ore precedenti e successive al parto a causa dell'edema da parto. L'elevata ipertensione arteriosa determina la presenza extravasale di liquidi che rendono la vulva e la mammella (sebbene in minore entità) di consistenza molle, e di aspetto traslucido. La consistenza così acquisita ne aumenta il peso, e ne riduce la sua resistenza ai traumatismi originati dalle strutture che limitano la scrofa posteriormente. Sono frequentissime le lacerazioni ed i tagli che, infettandosi a causa della contaminazione fecale, producono dolorabilità, ipertermia ed anche, per via ascendente, vaginiti o cerviciti di tipo settico che potrebbero essere l'esordio di ben più gravi sindromi (MMA).
Anche queste tecnopatie devono essere annoverate tra quelle che possono essere ridotte nella loro insorgenza grazie allo studio di barriere architettoniche e pavimentazioni nel pieno rispetto delle dimensioni della scrofa.
La letteratura riporta inoltre un singolare caso di cannibalismo tra suinetti e scrofa ove era questa ultima a subire le aggressioni dei suinetti (cannibalismo inverso). Ladewig J. E. e collaboratori hanno ipotizzato che l'attenzione dei suinetti verso la vulva della madre era indotta dalla presenza piccole lesioni traumatiche provocate dalla pavimentazione fessurata (51). Numerose osservazioni personali confermano la presenza di fenomeni di cannibalismo inverso in cui i suinetti aggrediscono la scrofa a livello delle lesioni traumatiche presenti a livello di arti e scapola.

TEMPERATURA E COMFORT

I suini sono animali omeotermici, ovvero mantengono una temperatura corporea costante in diverse condizioni ambientali mediante un bilanciamento della perdita e della produzione di calore (57). La zona termoneutrale (ZTN) è una zona di indifferenza termica, in cui le condizioni climatiche sono ottimali per l'animale. Il limite inferiore della zona termoneutrale prende il nome di temperatura critica inferiore (TCI), mentre il limite superiore di temperatura critica superiore (TCS); la TCI e la TCS rappresentano i valori soglia (in termini di temperatura) per quanto riguarda rispettivamente lo stress da freddo e da caldo. E' importante mantenere l'animale all'interno della sua zona termoneutrale, perché in questo modo l'animale avrà bisogno solo di uno sforzo minimo per mantenere la propria temperatura corporea. Al di sopra della TCS aumenterà la

frequenza respiratoria e la temperatura rettale e diminuirà l'assunzione alimentare; al di sotto della TCI l'animale necessiterà di aumentare la sua produzione di calore e quindi avrà bisogno di più energia alimentare per il mantenimento a discapito della produzione. La TCI e la TCS non sono valori fissi ma dipendono da fattori legati all'animale (età, condizione corporea, genetica) e da fattori ambientali (livello alimentare, tipo di pavimento, ecc.).
Sebbene il suino abbia un pelo rado e quindi un'ampia superficie cutanea libera per disperdere calore, le numerose ghiandole sudoripare presenti a livello cutaneo sono per lo più non funzionali; il suino, quindi, può disperdere acqua e calore attraverso la sudorazione solo in modica quantità.
Il raffreddamento corporeo viene quindi ottenuto tramite specifici comportamenti di termoregolazione, efficaci esclusivamente se il suino ha libero accesso a substrati freddi (55). In particolare, il suino domestico preferisce un raffreddamento per conduzione piuttosto che attraverso altre forme quali l'acqua o l'aria fredda ed è stato dimostrato che la scrofa predilige una superficie fredda dove coricarsi (16) piuttosto che superfici umide (55).
E' generalmente accettato che le necessità termiche della scrofa lattante differiscono da quelle dei suinetti. In accordo a Mullan (*dati non pubblicati, citati da Black J.L. et al., 1993 (10)*) la zona di comfort termico è tra 12 e 22° C per la scrofa e tra 30 e 37° C per i suinetti, anche se la letteratura fornisce poche informazioni circa la TCI e la TCS a causa delle ovvie difficoltà sperimentali. La temperatura cutanea, ad esempio, è difficile da valutare nella scrofa lattante, dal momento che differisce ampiamente tra le diverse zone del corpo: la temperatura della cute mammaria è 5-8°C superiore alla temperatura della cute del dorso ed è meno influenzabile dai cambiamenti della temperatura ambientali (71).
Per le scrofe non lattanti la TCS e la TCI diminuiscono leggermente con l'aumento del peso corporeo a causa di un cambiamento del rapporto tra la superficie corporea ed il peso. Tuttavia, con la scrofa lattante, Makkink C.A. (54) ha constatato un aumento della TCS con l'aumento del peso corporeo (grafico 4).

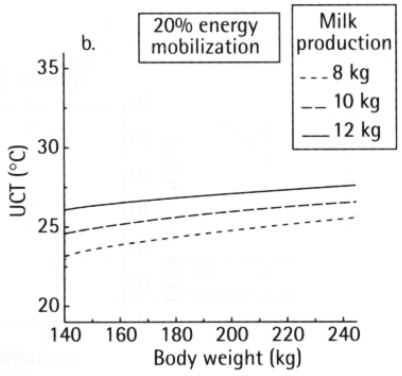


Grafico 4: effetto del peso corporeo sulla TCS nella scrofa lattante (Makkink C.A., 1998, modificata, 54).

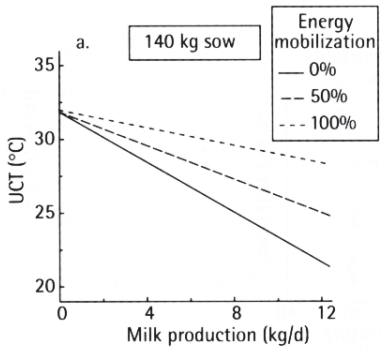


Grafico 5: effetto della produzione di latte sulla TCS (Makkink C.A., 1998, modificata, 54).

Il grafico 5 mostra le possibilità che ha la scrofa quando la temperatura supera la TCS: mobilizzazione maggiore di riserve corporee per mantenere la produzione lattea al medesimo livello o diminuzione della produzione di latte (54).

Quando le temperature della sala parto superano i 22°C le scrofe soffrono di stress da caldo. La scrofa diminuirà l'assunzione di cibo per ridurre il calore corporeo; per mantenere la produzione di latte la scrofa dovrà mobilizzare le sue riserve corporee, strategia che porterà ad una diminuzione del peso corporeo e ad un assottigliamento dello spessore del grasso. Nonostante questo tentativo la scrofa non è in grado di mantenere la produzione di latte allo stesso livello: molti studi hanno confermato che la crescita dei suinetti è negativamente influenzata dalle alte temperature ambientali (54).
Pubblicazioni recenti indicano anche che gli effetti negativi delle temperature elevate sulla produzione di latte non sono esclusivamente legati ad una diminuita assunzione di energia, ma anche ad adattamenti fisiologici allo stress da caldo, come i cambiamenti della direzione del flusso sanguigno che viene diretto alla cute per aumentare le perdite di calore a discapito della mammella (10).
Barb C.R. (8) ha dimostrato una funzione endocrina alterata (diminuita frequenza dei picchi di LH, modificazioni della risposta della prolattina, ecc.) nelle scrofe albergate a 30°C, il che suggerisce che la risposta dell'asse adreno-ipotalamo-pituitario sia soppressa dall'esposizione cronica a temperature ambientali elevate. La diminuzione della produzione di latte causata dallo stress da caldo non sembra essere dovuta ad una alterazione del comportamento dei suinetti ma a profondi cambiamenti fisio-metabolici nella scrofa (30).
Quiniou N. e coll. (63) hanno utilizzato 63 scrofe multipare di razza Large White per valutare l'effetto della temperatura ambientale (18°, 22°, 25°, 27° e 29°C) e di due differenti diete proteiche (14 e 17%) sulle *performance* di lattazione, mantenendo il livello termico assegnato ad ogni trattamento costante nei 21 giorni di lattazione ed alimentando *ad libitum* tra il 7° e il 19° giorno di lattazione. La dieta non ha influito sulle le performance di lattazione. Durante i 21 giorni di lattazione, l'assunzione di alimento/die/scrofa è diminuto da 5,67 a 3,8 Kg nel gruppo stabulato a 29°C vs 18°C. Questa diminuzione si è distribuita nei gruppi in maniera lineare, con valori oscillanti tra 1,49-3,25-10,20 MJ di ED assunta/giorno negli

intervalli 18-25, 25-27 e 29°C. Il gradiente termico tra la temperatura cutanea e rettale è stato minimo (2°C) sotto i 27°C e nullo tra i 27° e i 29°C. La frequenza respiratoria nelle scrofe lattanti era aumentata da 26 a 124 atti respiratori/minuto nel confronto 18°/29°C, indicando in 22°C la soglia termica critica per una sufficiente dispersione cutanea del calore. La perdita di peso corporeo è variata da 23 a 35 Kg/capo a temperatura variante dai 18° a 29°C, senza influenzare la composizione dei tessuti. L'incremento ponderale/die dei lattonzoli non ha espresso particolari differenze a T comprese tra 18° e 25°C (241g/die) mentre si è ridotto sopra i 25°C (212 g/die) e tra 27° e 29°C (189 g/die)
La temperatura della sala parto è in grado di influenzare negativamente la riproduzione: gli effetti negativi delle alte temperature incidono sull'anaestro, la lunghezza dell'estro, il tasso di concepimento, l'intervallo svezzamento-concepimento, la sopravvivenza degli embrioni, la crescita e la sopravvivenza fetale (42, 72).

Come risolvere il dilemma? In natura, le diverse esigenze termiche dei suinetti sono soddisfatte dalla presenza del nido, grazie alle capacità coibentanti dei materiali con cui è costruito; in cattività, la mancanza di tali materiali impone la fornitura esogena di calore per impedire eccessive dispersioni termiche dei suinetti. La sala parto deve conciliare esigenze di temperatura assai diverse per gli animali ospitati cercando di ottenere un compromesso, ma in genere, per l'importanza economica dei suinetti, il risultato è il sacrificio del *comfort* della scrofa, sebbene le elevate temperature ambientali non saranno comunque sufficienti per i suinetti. In pratica, la creazione di due aree a temperatura diversa appare la soluzione migliore attraverso l'impiego di raffreddatori e riscaldatori appositamente localizzati.
Per rendere la scrofa in grado di dissipare calore sono a disposizione diversi metodi. In generale i mezzi che utilizzano una perdita di calore per evaporazione sono i più efficaci, dal momento che alle alte temperature l'evaporazione è responsabile dal 44 al 63% della perdita totale di calore (18). Bagnare la cute dell'animale potrebbe aiutare ad aumentare le perdite di calore per evaporazione (5).
Murphy J.P. (59) ha studiato i *drip cooling* durante gli ultimi 19 giorni di lattazione ad una temperatura di circa 30°C: questo sistema è stato in grado di diminuire la frequenza respiratoria delle scrofe, ha aumentato il peso di svezzamento dei suinetti e l'assunzione alimentare della scrofa e ne ha diminuito la perdita di peso.
Stansbury W.F. et al (66) hanno studiato gli effetti degli *snout coolers* sulle *performances* della scrofa e della nidiata a diverse temperature, dimostrando che tale dispositivo era in grado di aumentare l'assunzione di cibo della scrofa solo a temperature maggiori di 25°C, ma era responsabile anche di una maggiore mortalità dei suinetti, probabilmente a causa della perdita di calore più rilevante.
McGlone J.J. et al. (55) mettendo a confronto *drip cooler, snout cooler,* tipo di pavimento (pavimento pieno fessurato e grigliato metallico rivestito in materiale plastico), ha concluso che i *drip cooler* siano i più efficaci per ridurre lo stress da calore (aumento dell'assunzione di alimento, riduzione della perdita di peso e riduzione della frequenza respiratoria), ricordando, tuttavia, che si dovrebbe evitare di bagnare il pavimento dal momento che questo è causa di stress da freddo per i suinetti.
La riduzione della produzione di calore attraverso misure nutrizionali, seppure sperimentata, è risultata meno efficiente rispetto ai metodi che promuovono la termodispersione (10).
I materiali dei pavimenti possono influenzare la perdita di calore per conduzione, come mostrato da Johnston L.J. et al (44), che ha rilevato una maggiore assunzione alimentare e minori ISE in scrofe albergate su pavimentazioni in cemento piuttosto che su grigliato in metallo

rivestito di plastica. Tuttavia i pavimenti freddi predispongono la ghiandola mammaria alla mastite, come suggerito da Ewbank R. (31).
La perdita di calore avviene anche durante il riscaldamento dell'alimento o dell'acqua ingerita che devono essere portati alle temperature corporee; quindi potrebbe essere utile fornire acqua e cibo fresco (40), anche se durante le fasi iniziali della lattazione le scrofe potrebbero essere letargiche e non consumare sufficienti quantità di cibo e acqua (33).
Concludendo, dato che gli effetti delle basse temperature sui suinetti (tasso di sopravvivenza e accrescimento) sono molto più forti durante i primi giorni di vita, mentre gli effetti negativi delle alte temperature sulla produzione di latte della scrofa sono predominanti durante la fase centrale e tardiva della lattazione, un compromesso potrebbe essere quello di variare le temperature della sala parto privilegiando i suinetti durante la fase precoce della lattazione e quindi abbassandole nella fase centrale e finale della lattazione.

L'ACQUA: IL COMPORTAMENTO, I FABBISOGNI

L'acqua, benché sia l'elemento di cui gli animali necessitano in maggiore quantità ed il più essenziale,viene spesso definita come "l'alimento dimenticato" dal momento che virtualmente ha ricevuto molta meno attenzione rispetto agli altri nutrizionali (15). Nonostante questo ruolo vitale, le nostre conoscenze sui fabbisogni quali-quantitativi di acqua degli animali sono sorprendentemente limitate (32).
Vari studi hanno mostrato che l'assunzione di acqua nella scrofa lattante è influenzata da diversi fattori, in particolare essa sembra aumentare con l'aumento dell'assunzione di alimento (34) e con un aumento della percentuale di proteine nella dieta (53).
Sebbene numerosi studi abbiano riportato ampie variabilità individuali nell'assunzione di acqua da parte delle singole scrofe (14), si rileva un andamento comune suddivisibile in due periodi: pochi giorni dopo il parto quando le assunzioni sono basse ma in continuo aumento e il periodo di assunzione relativamente stabile a lattazione avviata (32). Durante i primi 3 giorni molte scrofe assumono meno di 10 litri al giorno di acqua e gli aumenti di peso delle nidiate sono significativamente correlati alla quantità di acqua ingerita. Nella seconda settimana vi sono meno evidenze che l'assunzione di acqua (10-20 litri in media al giorno) delle scrofe sia un fattore limitante per la lattazione (33).
Un altro riscontro interessante è la relazione tra il tempo di attività in sala parto della scrofa ed il consumo di acqua. Come è possibile apprezzare in tabella 3, il tempo dedicato dalla scrofa all'abbeverata è limitato in prossimità del parto (33).

Tabella 2: percentuale di tempo attivo (in piedi o seduta) e assunzione di acqua durante le 24 ore prima e le 72 ore dopo l'inizio del parto (Fraser D. e Phillips P.A., 1989, modificata, 33).

tempo in relazione al parto	percentuale di tempo speso attivamente (media e range)	assunzione di acqua (litri) (media e range)	r2
24 prima	30.5 (22.4-42.8)	12.8 (5.6-24.1)	0.63
1-24 ore dopo	5.1 (1.5-14.9)	4.9 (0.0-15.7)	0.71
25-48 ore dopo	6.5 (1.8-15.3)	8.4 (1.0-21.2)	0.92
49-72 ore dopo	8.2 (2.7-15.3)	10.9 (3.2-20.0)	0.58

La fonte per l'abbeverata è assai importante, infatti, quando ai suini viene data la possibilità di scelta tra una tazzetta con acqua pulita o un succhiotto, l'attenzione è rivolta verso la prima, tuttavia non appena l'acqua nella tazza si contamina con l'alimento proveniente dalle loro bocche viene preferito l'utilizzo del succhiotto (15).
Dal momento che ridotte assunzioni di acqua determinano una maggiore quantità di sostanza secca nelle feci (che potrebbe predisporre le scrofe alla MMA) è importante assicurarsi che le scrofe non abbiano assunzioni limitate nel periodo *peri partum* (14).
Per fornire il fabbisogno idrico quotidiano alla scrofa deve essere posizionato un abbeveratoio che consenta alla scrofa di dissetarsi con il minimo spreco. L'abbeveratoio dovrebbe essere posizionato a 75-90 centimetri dal pavimento, essere facilmente accessibile e non schermato o nascosto da altre strutture e fornire 2 litri di acqua al minuto. E' importante, inoltre, ricordare che le malattie possono avere un forte impatto sulle necessità di acqua, ad esempio, problemi renali cronici possono portare a fabbisogni di addirittura 140 litri al giorno.

GAS NOCIVI

Non vi sono relazioni specifiche tra gas tossico-nocivi e scrofa in lattazione, ciononostante sono ben noti i loro generali effetti negativi sul suino.
L'ammoniaca è il più comune veleno ambientale e negli ambienti ben gestiti rimane al di sotto delle 5 parti per milione. L'uomo è in grado di apprezzare l'ammoniaca ambientale allorquando essa superi i 10 ppm. Livelli tra i 50 ed i 100 ppm riducono le *performances* zootecniche (IPG) ed inoltre, viene ridotta la *clearance* dei batteri dal polmone.
L'anidride carbonica è un normale componente dell'aria, ma allorquando superi il livello di 3000 parti per milione crea problematiche riducendo l'efficienza degli scambi respiratori essendo, di norma, correlata a bassi livelli di ossigeno.
Non deve essere trascurato anche l'idrogeno solforato che si sprigiona dai liquami per effetto della moltiplicazione dei batteri anaerobi. Il livello accettabile dovrebbe essere inferiore ai 5 ppm, anche se in molti insediamenti il livello è superiore a 100 ppm. Una eccessiva contaminazione ambientale da idrogeno solforato determina irritabilità, abbattimento, capogiri, mal di testa, fino, per concentrazioni superiori ai 400 ppm, a incoscienza e morte (58).
Un eccesso di tutti questi gas riduce notevolmente il *comfort* della scrofa e della nidiata, alterando il loro corretto rapporto: stati flogistici respiratori, alterazione del sensorio determinano una iporeattività della prole che riduce la frequenza e l'intensità delle poppate, determinando di riflesso, una riduzione del latte prodotto ed una riduzione dello sviluppo della ghiandola mammaria. Se nelle unità moderne l'inquinamento ambientale interno è contenuto per effetto del giusto equilibrio tra ventilazione e riscaldamento attivo, nelle strutture più datate o obsolete o non ben mantenute è frequente l'impossibilità di una corretta ventilazione.

LATTAZIONE E NIDIATA

Il buon andamento della prima lattazione e delle lattazioni successive è inesorabilmente correlato alla corretta interazione della scrofa con la sua nidiata.
La ghiandola mammaria cresce in modo significativo durante la lattazione e questa crescita è strettamente correlata all'aumento di produzione di latte che consente la crescita dei suinetti (46).

Una volta che il *teat order* è stato stabilito, le ghiandole mammarie che non vengono regolarmente munte iniziano a regredire mediante un processo di involuzione. La fisiologia della scrofa lattante durante la lattazione può essere influenzata negativamente dalla presenza di ghiandole mammarie non munte. Questa condizione può influenzare la quantità di tessuto mammario produttivo che si sviluppa nelle ghiandole sottoposte a mungitura, inoltre, la loro regressione avviene rapidamente nella prima settimana di lattazione. I tentativi di aumentare la numerosità della nidiata mediante baliaggio dopo diversi giorni sono privi di successo a causa della perdita della funzionalità del tessuto e l'irreversibilità del processo involutivo. Il grado di regressione delle ghiandole non munte è influenzato dall'energia della dieta e dai livelli proteici che la scrofa riceve durante la lattazione ed è in genere più lento nelle condizioni di alimentazione dove la crescita delle ghiandole munte è più rapida.
Aumentare la produzione di latte e il tasso di crescita delle ghiandole munte attraverso una ottimizzazione dell'assunzione dei nutrienti durante la lattazione determina anche il mantenimento di una massa maggiore di tessuto nelle ghiandole mammarie non succhiate (46).
Le scrofe con nidiate più grandi producono quantità maggiori di latte rispetto a scrofe con nidiate più piccole. Le scrofe con 12 suinetti producono più del 50% in più di latte delle scrofe con 6 suinetti (47, 48).
La produzione totale di latte aumenta con l'aumentare della grandezza della nidiata ma la quantità di latte per suinetto svezzato diminuisce (29, 48, 4, 46). Auldist D.E. (4) ha dimostrato che l'incremento di peso totale della nidiata aumenta con l'aumentare del numero dei soggetti della nidiata, ma vi è una diminuzione dell'incremento di peso per ogni suinetto svezzato.
Quando una scrofa partorisce ha un numero definito di ghiandole mammarie potenzialmente funzionanti che rappresenta il numero massimo di ghiandole che potrà avere durante i cicli di lattazione. Kim S.W. et al. (46) ipotizza tuttavia, che la potenzialità produttiva futura di ogni ghiandola possa essere influenzata dal ciclo di lattazione precedente ovvero dal fatto che la ghiandola sia stata o no munta e dal grado di mungitura a cui è stata soggetta. Ghiandole che sono più grandi al termine del periodo involutivo saranno più produttive nella lattazione successiva; in questa ottica scrofe che allattano un numero inferiore di suinetti nella prima lattazione saranno meno produttive in quella successiva rispetto ad animali che già in prima lattazione hanno una nidiata più numerosa. Questo potrebbe suggerire di massimizzare il numero di suinetti in prima lattazione per aumentare la produttività nella lattazione successiva (46).

DISTURBI DELLA LATTOGENESI

La lattogenesi

La lattogenesi è la funzione di produrre il latte (insieme di lattosio, proteine, lipidi, lattociti, leucociti, minerali, vitamine, ecc.).
La lattogenesi può essere suddivisa in:

- prima fase: preparazione del tessuto mammario alla produzione del latte
- seconda fase: produzione del latte.

È possibile rintracciare il latte nelle ghiandole attorno al 90°-105° giorno di gestazione, ma la sua eiezione e la sua produzione massiccia potrà essere evidenziata solo in conco-

mitanza o nell'imminenza del parto (50).
I fattori che regolano la produzione e l'eiezione del latte sono: la rimozione del latte prodotto, la frequenza di allattamento, il controllo ormonale, la disponibilità di nutrienti e acqua.
La rimozione del latte è il fattore più importante per mantenerne la secrezione e promuovere l'aumento del tessuto ghiandolare. Dal momento in cui il latte è prodotto, staziona nel lume alveolare e uno dei suoi componenti, il *Feedback Hinibitor of Lactation*, impedisce l'ulteriore sintesi. Ne deriva che la mancanza dell'allontanamento del latte impedisce la lattogenesi e favorisce l'involuzione degli alveoli. L'aumento della pressione sanguigna intrammammaria determina, inoltre, la riduzione dell'afflusso ematico. Di effetto opposto, quindi, è il poppata e il massaggio della ghiandola da parte dei suinetti che aumentano la circolazione della prolattina.
Thodberg K. e Sørensen M.T., nel 2006 hanno pubblicato i risultati di una articolata sperimentazione nella quale uno degli scopi fu quello di verificare se l'entità del massaggio post lattazione della mammella da parte dei suinetti può influenzare la quantità di latte prodotto (a 7 e 14 giorni post parto) e il peso della ghiandola mammaria dopo 28 giorni di lattazione. Sul significato del massaggio post allattamento sono state fatte alcune ipotesi: marcamento con odori, stimolazione e regolazione della produzione di latte per la poppata successiva. Nella loro esperienza gli autori non sono stati in grado di confermare un aumento della produzione di latte al maggior massaggio post poppata, individuando, invece, un maggior peso delle mammelle (68).
La frequenza di allattamento gioca un ruolo importante: è intorno a 17 nelle fasi subito successive al parto, per raggiungere i 35 allattamenti durante il picco di lattazione (8-10 giorni dopo il parto) e discendere attorno alle 20-30 in prossimità dello svezzamento. La frequenza di lattazione appare omogenea tra notte e giorno fino al 10° giorno, mentre decresce durante la notte verso il 17°. Un fatto dagli importanti risvolti pratici è che la frequenza di poppata è maggiore nelle nidiate allattate da una scrofa con bassi livelli alimentari; questo fatto è facilmente spiegabile dalla minore sostanza secca ingerita dai suinetti. Il riempimento della ghiandola mammaria, completo già solo dopo 35 minuti dalla poppata, non può essere sfruttato negli allevamenti con il trasferimento dei suini digiuni da una scrofa all'altra, dal momento che le scrofe che popolano una sala parto sincronizzano tra loro la poppata. L'ascolto, ad intervalli di 35-42 minuti del tipico grugnito emesso dalla scrofa per richiamare i suinetti alla mammella ha dato risultati incostanti o poco promettenti (50).
L'attivazione dei recettori neurali attraverso il massaggio e la suzione innesca il controllo ormonale che comprende il rilascio di ossitocina, prolattina, ormone della crescita (GH), ACTH e il TSH (*thyroid stimulating hormone*). Il ruolo del GH è diretto (regola la composizione del latte) ed indiretto (regola la concentrazione plasmatica di *insuline-like growth factor*), ma nonostante ciò, scrofe immunizzate contro il fattore del rilascio di GH non hanno mostrato una riduzione della crescita dei suinetti, dimostrando che il GH ha un ruolo solo favorente e non essenziale alla lattazione. Il ruolo della prolattina dopo che la lattazione è iniziata è ancora controverso, anche se studi su scrofe nelle quali la secrezione di prolattina era stata inibita avevano evidenziato che la crescita dei loro suinetti era inferiore durante la soppressione dell'ormone (50).
Come noto, anche le strategie alimentari influenzano la lattogenesi, ciononostante il periodo più rischioso è quello del picco produttivo tra i 7 ed i 15 giorni oltre il quale si instaura una limitazione della produzione con finalità, probabilmente, di tipo conservativo.

La produzione di latte richiede un ottimo apporto di fonti nutritive ma nelle fasi iniziali le riserve organiche sono sufficienti, mentre non lo sono nelle fasi più avanzate; infatti, una forte riduzione alimentare non determina sostanziali variazioni della crescita delle nidiate nella prima settimana, ma molto evidenti con il prosieguo (in modo diverso a seconda dell'entità delle riserve).
Le quote di proteina e aminoacidi presenti nell'alimento rappresentano un fattore critico, in particolare la lisina è l'aminoacido limitante più importante dal momento che è stato evidenziato che la quota necessaria è di 26 grammi di lisina per ogni Kg/giorno di accrescimento dei suinetti. La valina e la isoleucina, ma non la leucina, aumentano la produzione di latte, probabilmente grazie al loro impiego da parte del succinil-CoA che potrebbe servire quale fonte energetica della ghiandola mammaria. Anche se la scrofa è in grado di attingere dalle masse muscolari aminoacidi per supportare la produzione di latte, un aumento della energia alimentare può mitigare la somministrazione di alimenti a basso tenore proteico.
Data la correlazione tra ingestione alimentare e lattogenesi, molti studiosi si sono concentrati sulla valutazione della correlazione tra ingestione e lattazione. In molti casi, pur ottenendo aumenti nell'ingestione non si sono ottenuti aumenti significativi sul peso delle nidiate.

I fattori che influenzano la capacità di ingestione della scrofa lattante sono:

- Genetica: la selezione ha prodotto animali con bassa percentuale di grasso corporale e maggiore prolificità e basso appetito; il risultato è che le riserve corporali e la quantità di cibo ingerito non sono sufficienti alle necessità di mantenimento, produzione di latte e accrescimento (specie nelle scrofette) nel periodo di lattazione.
- Alimentazione in gestazione e condizione corporea: l'utilizzo di diete fibrose migliora le capacità ingestive della scrofa. Femmine alimentate con alti livelli di energia tendono ad ingerire meno in lattazione. Un eccesso di condizione corporea riduce l'ingestione a causa dell'effetto feed back negativo del glicerolo e degli acidi grassi plasmatici sull'appetito. Gli animali grassi hanno un elevato livello basale di insulina che regola al basso l'ingestione di ulteriore cibo. Il livello ottimale del grasso dorsale è 20 mm circa.
- Appetito: regolato da un complesso sistema che coinvolge il sistema nervoso centrale, il sistema nervoso periferico, equilibri fisici, metabolici ed ormonali.
- Giorno di lattazione: dopo una riduzione dell'assunzione di alimento nei giorni successivi al parto (dovuto alla riduzione del volume dello stomaco), la scrofa aumenta la quantità di alimento e la frequenza di assunzioni rispetto alla gestazione fino a raggiungere i massimi livelli attorno alla 2a-3a settimana.
- Ordine di parto: l'aumento del peso e dell'ordine di parto aumenta le necessità di mantenimento e quindi aumenta l'assunzione. Le richieste nutrizionali durante la lattazione delle scrofette rispetto alle scrofe sono differenti tanto che alcuni allevatori implementano differenti diete.
- Numero dei suinetti lattanti: un maggior numero di figli determina un aumento lineare della produzione di latte, ciononostante può esistere una variabilità correlata alla presenza ed al tipo di alimento per i suinetti.
- Durata della lattazione: il picco della produzione lattea avviene più precisamente attorno ai 18-21 giorni post parto: svezzare prima significa ridurre consumo alimentare e produzione di latte.

- Ambiente: temperatura e umidità relativa, qualità dell'aria e ventilazione.
- Fotoperiodo stagionale: come conseguenza dei differenti livelli produttivi stagionali.
- Presenza di malattie: per molti e facilmente comprensibili motivi le patologie possono causare disturbi dell'alimentazione.
- Programmi di alimentazione: è raccomandato ridurre le quantità di cibo nei primi giorni di lattazione per contrastare la presenza edema mammario, contenere lo spreco di cibo ed evitare bassi consumi futuri. E' utile dividere il mangime in un numero di pasti maggiore possibile.
- Digeribilità della dieta: una maggiore digeribilità può aiutare ad aumentare il consumo.
- Composizione della dieta: la presenza di fattori antinutrizionali (funghi, tannini, micotossine, ecc.), e/o alti livelli di minerali riducono l'ingestione mentre l'inclusione di ingredienti appetibili, in talune circostanze possono aumentare l'ingestione.
- Concentrazione energetica della razione: equilibrio delle fonti lipidiche e tra queste e la materia proteica.
- Presentazione dell'alimento: una razione bagnata può aumentare l'assunzione anche del 15% rispetto alla farina secca. Anche il mangime a pellet è più vantaggioso rispetto alla farina.
- Disponibilità di acqua: il consumo di acqua di una scrofa lattante è di 20-35 litri al giorno. Il controllo della qualità fisico-chimica e batteriologica e della quantità di acqua è fondamentale per promuovere l'ingestione alimentare (50).

Temperatura corporea e lattazione

La normale temperatura corporea di una scrofa gestante è tra i 38,3°C ed i 38,5°C con possibilità di alcune piccole variazioni. Dopo il parto la temperatura corporea aumenta di 1°C e durante la lattazione la scrofa non riesce a mantenere una temperatura costante con fluttuazioni che possono andare dai 38,4°C ai 40,5°C (56). Tali variazioni sono correlate all'aumento della temperatura corporea per il particolare stato fisiologico (lattogenesi, aumento dell'ingestione) e per l'elevata temperatura ambientale. L'ingestione alimentare, la temperatura ambientale e la qualità delle strutture condizionano la temperatura corporea dell'animale. Animali con restrizioni alimentari presentano temperatura più bassa. Concludendo, la normale temperatura di una scrofa lattante pluripara è di 39,3-39,6°C. Questo consente di definire la nuova temperatura di riferimento come il risultato di una ipertermia metabolica, non correlata all'innalzamento del *set-point* termoregolatorio per effetto del pirogeno endogeno come accade nella febbre vera (35). Per comprendere se il rilievo della temperatura corporea possa efficacemente predire la comparsa di MMA, sono state sottoposte a rilievo termico 55 scrofe per tre giorni prima e tre giorni dopo il parto, alla mattina e alla sera. Le scrofe, di seguito classificate in tre gruppi (MMA grave, moderata, assente) hanno potuto indicare che la temperatura delle "MMA grave" era significativamente più alta rispetto alle "MMA moderata" e "MMA assente" sia alla mattina (39,2°C vs 38,7°C, $P \leq 0,01$) che alla sera (39,8°C vs 39,0°C, $P \leq 0,01$). L'indicazione della prova è quella di considerare la temperatura di 39,4 gradi centigradi 12-18 ore dopo il parto come valore soglia per il trattamento terapeutico.

DISTURBI DELLA LATTAZIONE

Le patologie che compaiono nella scrofa a cavallo del parto vengono definite *sindromi perinatali*, mentre quelle che avvengono nel primo periodo di lattazione sono denominate sindromi puerperali (6). Il sintomo più frequente delle *sindromi puerperali* è l'agalassia, ma esistono una moltitudine di altri quadri che, pur non influenzando la produzione di latte, determinano una grave compromissione della scrofa.
I quadri morbosi possono anche essere distinti in base:

1) all'agente eziologico;
2) all'apparato coinvolto;
3) al momento della comparsa.

Nella patologia puerperale è difficile definire i limiti epidemiologici in modo stretto in quanto in molti casi il momento dell'espressione clinica è solo la punta dell'*iceberg* di una malattia che aveva origini ben più lontane.

Tra le diverse ipotesi di classificazione riteniamo che sia più pratico utilizzare quella basata sul momento dell'insorgenza della sindrome o del momento critico che può portare alla sua manifestazione.

Tabella 3: classificazione dei quadri morbosi del periodo puerperale della scrofa

Periodo	Definizione/nome	Causa	Implicazioni
Pre parto	Trauma ai capezzoli	Trauma	Mancata/ridotta eiezione lattea, MMA
	Patologia osteoarticolare	Trauma Stati dismetabolici	Riduzione della assunzione di alimento e liquidi, Endotossicosi, Ipertermia, Ipogalassia, MMA
	Alterazione anatomiche dell'apparato riproduttivo esterno	Traumi	Traumi durante il parto, MMA
	Infezione urinaria	Batteri, miceti	Cerviciti, Vaginiti, Endometriti, Ipogalassia, MMA, VDS, Parto languido, Ipertermia
	Cervicite Vaginite	Batteri	Endometriti, Infezioni urinarie, Ipogalassia, MMA, VDS, Parto languido, Ipertermia
	Sindrome da mancato adattamento alla gabbia parto	Disturbo comportamentale	Riduzione della assunzione di alimento e liquidi, MMA
	Papillomatosi del capezzolo	Papillomavirus	Mancata/ridotta eiezione lattea, MMA
Intra / peri parto	Trauma uterino, cervicale, vaginale	Trauma	Emorragie, Infezioni locali, MMA, VDS
	Distocia	Distocia	Infezione locale, VDS, Morte
	Torsione uterina	Ectopia	Morte
	Mastite	Batteri	Ipo/agalassia, Morte
	Ipocalcemia	Stati dismetabolici	Parto languido, Ipogalassia, Morte
	Obesità	Obesità	Parto difficoltoso, Ipertermia, Chetosi
	Stitichezza	Nutrizione	Parto difficoltoso, Ipogalassia, MMA
	Edema mammario e della vulva	Contenzione inadeguata Iperalimentazione Sedentarietà Squilibrio elettrolitico Inadeguatezza della gabbia	Traumi, Infezioni locali, MMA
	Inerzia dell'utero	Disendocrinia Disturbi elettrolitici Stress Carenza di Vitamina E e Selenio	Parto languido, Morte
	Mancato sviluppo della ghiandola mammaria	Micotossine	Ipogalassia Carenza di acqua
Post parto (in aggiunta a quelle descritte per il periodo pre parto)	Infezioni dell'utero	Batteri	Ipertermia, Endotossicosi, Ipogalassia, MMA, VDS, Morte
	Ritenzione fetale	Ritenzione fetale	Ipertermia, Endotossicosi, Ipogalassia, MMA, VDS, Emorragia, Morte
	Ipertermia	Disturbo della termoregolazione (?) Patologie batteriche o virali latenti riacutizzate (PRRS, FLU, M. di Aujeszky, *M. hyopneumoniae, P.multocida,* Streptococcus sp., ecc.)	Disgalassia, Appetito capriccioso, Morte

La mastite

La mastite è l'infiammazione di una o più ghiandole mammarie causata da una ampia varietà di specie batteriche; può essere primaria (i batteri risalgono il dotto canalicolare o sono già presenti all'interno della ghiandola in una forma latente che si riacutizza con la lattogenesi) o secondaria ad altre patologie (es. edema mammario, scarsa eiezione, setticemia).

La mastite può essere un evento sporadico o un evento che colpisce numerosi animali all'interno del medesimo allevamento.

Purtroppo, il livello di ricerca sulle mastiti suine è di molto inferiore a quello delle mastiti bovine, pertanto le conoscenze sono spesso frammentarie e si basano molto sull'empirismo La mastite da E.coli e da Klebsiella spp. è molto frequente e si sviluppa con elevata gravità. La mastite da coliformi inizia in prossimità del parto, ma i suoi sintomi sono evidenti solo 12 ore dopo. Il rilascio delle endotossine provoca una marcata riduzione della produzione di latte e la mammella si presenta da pallida a bluastra fino a nerastra (mastite necrotica). Il problema aziendale si manifesta quando esiste una forte contaminazione ambientale e dell'acqua di abbeverata da parte di batteri; questi concorrono alla formazione di un biofilm potenzialmente patogeno che riesce a "forzare" le barriere difensive naturali della mammella. La scrofa presenta sintomi generali quali: ipertermia (fino a 42°C), agalassia, anoressia, cianosi delle estremità, morte.

La mastite stafilococcica e streptococcica hanno connotati meno violenti della mastite da coliformi. Un animale colpito può presentare interessamento di una o più mammelle che clinicamente presentano indurimento da lieve a marcato, il latte è alterato e nelle forme più gravi è possibile la secrezione di materiale purulento.

La sindrome Mastite-Agalassia-Metrite (MMA)

Con la dizione MMA o sindrome puerperale della scrofa si identifica l'associazione nel puerperio di tre processi morbosi che talvolta possono comparire ed evolvere indipendentemente oppure complicarsi in una sepsi puerperale (6).

La Mastite-Metrite-Agalassia è una complessa sindrome polifattoriale che colpisce la scrofa 1-3 giorni dopo il parto e può scatenarsi indifferentemente da una delle tre condizioni-base (6) che modulano l'insorgenza delle altre due.

L'incidenza della malattia negli allevamenti è sconosciuta anche se è possibile affermare che tutti gli allevamenti ne soffrono occasionalmente o più diffusamente.

In alcuni allevamenti, pur essendo presenti sintomi puerperali del tutto riferibili a MMA non viene emessa una diagnosi completa perchè diagnosi e terapia si sono limitati agli aspetti più evidenti (ad.es. metrite) della malattia. Secondo Harvey R. (2001) la MMA deve essere sospettata in caso di peso allo svezzamento inferiore ai 4 chili a 24 giorni di età (39).

Le cause, i fattori epidemiologici

L'eziologia della MMA non è sempre chiara, ma l'invasione batterica della ghiandola mammaria o del tratto genitale appare la più frequente. In effetti, durante le modificazioni anatomiche che intervengono nei giorni prima del parto, sia l'utero che la mammella offrono meno resistenza all'ingresso di batteri potenzialmente patogeni. La colonizzazione batterica può anche non essere di entità sufficiente per palesarsi, ma sufficiente per produrre l'endotossiemia che è alla base della MMA. L'endotossiemia può

portare ad una riduzione di PGF2α uterina che è un importante stimolo alla produzione di prolattina. Bassi livelli di prolattina contribuiscono alla ipo-agalassia.
Il positivo esito della somministrazione di antibiotici in allevamenti che segnalano problemi di MMA conferma il ruolo dei batteri nella sindrome; questo è stato anche supportato da Tabajara (1992) che migliorò tutti i parametri produttivi somministrando spiramicina in associazione a trimethoprim e sulfadiazina in un allevamento "problema" (67).
In molte ricerche è stata dimostrata la presenza di batteri uterini o endomammari quali streptococchi, stafilococchi, E.coli, micrococchi, ma la ubiquità degli stessi ha suggerito che la malattia non sia sostenuta da una infezione primaria, ma bensì da un evento secondario ad una infezione opportunistica. Tra questi batteri E.coli è senza dubbio il più diffuso responsabile della metrite e/o mastite, per questo è da alcuni ritenuto importante il controllo delle intossicazioni e delle infezioni gastroenteriche e una corretta conduzione alimentare (38).
In una ricerca non recente del 1978, Elmore R.G. (28) ha studiato l'effetto di una infusione intrammammaria di endotossina di E.coli (132-66-33 mg/100Kg p.v.) 24 ore dopo il parto: l'aumento della temperatura già due ore dopo l'infusione, il riscontro dell'endotossiemia, l'alterazione della formula leucocitaria (declino), i sintomi clinici (diarrea, vomito, depressione, letargia, agalassia, indurimento e aumento della temperatura della mammella, riluttanza al movimento, incoordinazione, morte), confermano la capacità del tessuto mammario di permettere l'assorbimento dell'endotossina nel sistema circolatorio che diviene responsabile di sintomi del tutto sovrapponibili alla MMA.
Quale che sia l'origine dei LPS (ambientale, enterico, uterino, urinario) e il distretto di assorbimento, il loro ruolo è senza dubbio focale dal momento che è stato dimostrato che, dopo l'assorbimento, sono in grado di riprodurre le modificazioni cliniche della MMA.
Anche le sindromi urinarie (eventualmente scatenate da ritenzione urinaria, promossa anche da pavimentazioni o stabulazioni inadeguate alla levata con conseguente riduzione dell'assunzione di acqua, ecc.), aumentano la contaminazione batterica ambientale favorendo le infezioni mammarie per via endocanalicolare.
Alcuni elementi zootecnici possono influenzare positivamente la comparsa della MMA:

- sedentarietà,
- stabulazione troppo restrittiva,
- problemi locomotori,
- imbrattamento delle superfici a contatto con l'animale (contaminazione batterica),
- pavimentazioni scomode, scivolose, dolorose,
- stitichezza o diarrea,
- carenza di acqua,
- alimentazione eccessiva,
- dieta iperproteica (l'aumento dell'azoto da eliminare richiede una maggiore ingestione di acqua),
- maggiore numero di suinetti nati ,
- maggior numero di suinetti nati morti.

Segni clinici
I sintomi clinici sono caratterizzati da mastite, metrite e agalassia associate a febbre ed eventualmente a costipazione.
La mastite può interessare una o più mammelle che presentano alterazioni della loro consistenza e del loro volume. L'esame batteriologico del latte secreto può evidenziare

E.coli, streptococchi, stafilococchi.
La metrite è testimoniata dalla presenza di scolo vulvare (sintomo che non definisce univocamente la metrite ma che è comune alla cervicite-vaginite e a infiammazione della vescica o dei reni). La metrite è di origine batterica ascendente ed è causata da germi ambientali di origine fecale. Le cause che predispongono alla metrite sono le stesse che predispongono alla mastite alle quali si aggiungono:

- parti difficoltosi,
- esplorazioni ginecologiche,
- patologie genitourinarie.

L'agalassia, o l'ipogalassia, possono non essere clinicamente manifeste fino alla comparsa di un ritardo di crescita della nidiata o di alcuni suoi componenti, sempre accompagnato da comportamenti anomali prima, durante e dopo il tentativo di allattamento. La mancanza di latte è la prima causa di dimagramento del suinetto e di mortalità causata da mancanza di energia ingerita.
L'aumento della temperatura, seppur presente, non è elevato (1,0-1,5°C) tanto che da molti sono ritenuti i normali livelli raggiunti in una scrofa lattante. Anche la costipazione, quando presente, è moderata (39).

Diagnosi
La diagnosi, spesso non semplice, si basa sulla sintomatologia clinica (vedi tabella) e gli esami di laboratorio che possono essere eseguiti sul latte o sulle secrezioni vulvari (scoli) per l'identificazione del/dei germi ed eventualmente per lo sensibilità agli antibatterici.

Tabella 4: esame clinico e anamnestico della scrofa con problemi lattopoietici

Ambiente	Gruppo di scrofe	Scrofa	Suinetti	Mammella	Ghiandola	Capezzoli	Linfonodi retromammari	Vulva
Temperatura	Morbilità	Temperatura	Uniformità	Aspetto della cute	Consistenza	Integrità	Verifica volume	Verifica VDS
Umidità	Mortalità	Cute	Accrescimento	Aspetto alla palpazione: cute, sottocute, ghiandola	Grado di omogeneità del tessuto	Palpazione del dotto		Origine VDS
Ventilazione	Numero di ghiandole colpite	Alveo	Sazietà	Valutazione dell'uniformità tra le ghiandole	Scollamento con la fascia addominale	Verifica pervietà		Origine VDS
Disponibilità di alimento	atologie intercorrenti (cistiti, nefriti, zoppie, ecc.)	Appetito	Comportamento	Consistenza: dura, morbida, sfuggente, edematosa, granulosa, nodosa, legnosa, ecc. (*)				
Qualità dell'alimento	Tecniche di gestione alimentare e di allevamento (in gestazione e in lattazione)	Altre patologie (ascessi, zoppie, cistite, ecc.)	Patologie intercorrenti					
Condizioni igieniche	Trattamenti ormonali	Trattamenti effettuati	Numero svezzati e loro condizione					
Acqua: disponibilità, qualità, accesso, ecc.	Trattamenti medicamentosi	Esito trattamenti						
Condizioni della gabbia parto	Età	Condizioni ambientali						
	Recidiva	Stato di ingrasso						
	Piani vaccinali	Comportamento durante l'allattamento						
	Manualità ginecologiche	Manualità ginecologiche						

(*): la mammella ricca di latte e non munta è notevolmente aumentata di consistenza e potrebbe portare ad una errata interpretazione del quadro.

Terapia

La terapia consiste nel mettere in atto ogni tentativo per ripristinare la produzione di latte contrastando l'azione dei batteri patogeni e delle loro tossine e nel risolvere eventuali punti critici inerenti alla stabulazione e alla alimentazione della scrofa.

Gli antibiotici sono largamente utilizzati per il controllo delle infezioni. Somministrati per via parenterale o nell'alimento le molecole più utilizzate sono, con le dovute considerazioni farmacocinetiche, aminoglicosidi, chinoloni, ßlattamici, trimethoprim + sulfamidico.

In corso di metrite la medicazione endocavitaria è altrettanto utilizzata anche se di efficacia dubbia; i prodotti utilizzati sono disinfettanti e astringenti o soluzioni antibiotiche

che vengono inserite attraverso cateteri *melrose* o monouso.
Il controllo della febbre e dell'endotossiemia può essere efficacemente ottenuto attraverso l'uso di farmaci FANS, anche se nei casi gravi i cortisonici possono essere consigliati.
L'utilizzo dell'ossitocina come promotore della lattopoiesi e del secondamento è possibile durante (2-3 U.I.) e subito dopo il parto (10 U.I.), ma dopo 2-3 giorni la sua efficacia è assai limitata. L'utilizzo di ossitocina in corso di mastiti acute è consigliato per promuovere l'allontanamento dei germi presenti nella cisterna attraverso la produzione di latte e la sua mungitura da parte dei suinetti
La maggiore incidenza di patologie neonatali in suinetti allattati da scrofe con MMA determina frequentemente la necessità di effettuare un trattamento terapeutico e di supporto delle nidiate.

Profilassi
La profilassi è finalizzata al controllo di tutti i punti critici esaminati in precedenza.
In ordine di importanza potremmo definire come fondamentale il controllo su:

- misure igieniche: allontanamento delle deiezioni, drenaggio delle urine, aspersione di prodotti adsorbenti, utilizzo di materiale a perdere il giorno del parto, allontanamento immediato delle placente e dei suinetti morti;
- contenzione: dimensione e progettazione gabbia parto, battifianchi, educatori posteriori, ecc.;
- comfort della gabbia parto: pavimenti, mangiatoia;
- acqua: quantità, accesso, disponibilità, qualità, temperatura;
- pratiche ostetriche: abusi, igiene, modalità;
- alimentazione in gestazione: controllo dell'obesità e del tasso proteico;
- alimentazione in lattazione: presentazione (forma fisica), curve di razionamento, fibra;
- BCS prima del parto: lotta all'obesità;
- defecazione: controllo della stitichezza;
- peso alla nascita dei suinetti;
- temperatura ambientale: scrofa e suinetti;
- allattamento dei suinetti: molto importante è la suzione nelle prime ore dopo il parto;
- patologie locomotorie: unghie e apparato muscolo-scheletrico.

Alcune misure di profilassi mirata e programmata (metafilassi) sono costituite dall'utilizzo dell'ossitocina (vedi sopra), delle prostaglandine, del trattamento antibiotico o chemioterapico prima e dopo il parto, e lassativi (solfato di sodio o magnesio). Le lavande uterine, trovano la loro collocazione, eventualmente a scopo profilattico a secondamento avvenuto, ponendo particolare attenzione all'igiene della pratica.
Queste misure, associate a una corretta applicazione delle misure zootecniche sono di solito risolutive.
Perestrelo R. (1994) nella sua indagine retrospettiva indica alcuni punti che se presenti riducono il rischio di MMA:

- <25% di scrofette;
- buon livello igienico;
- pH dell'acqua >5.7;
- nitrati nell'acqua da bere inferiori a 60 mg/litro;

- assenza di infezioni urinarie;
- assenza di problemi locomotori;
- presenza di nido per i suinetti in gabbia parto;
- > di 2 fonti proteiche;
- < di 2 cambiamenti gestionali durante il parto;
- vaccinazione verso E.coli (67).

Alcuni Autori ritengono che esista una correlazione tra incidenza di turbe della lattazione e carenza di Vitamina E e Selenio (6); la relazione non è chiara anche se l'effetto potrebbe essere correlato a una maggiore resistenza degli epiteli all'azione delle endotossine e a una maggiore integrità ed efficienza dei leucociti. Per questo e per altri motivi, le diete vengono arricchite in vitamina E e Selenio anche se i risultati di somministrazioni controllate in corso di MMA non hanno dato i risultati sperati.

Sindrome disgalattica post partum (SDPP)

Con questo termine viene identificata una patologia caratterizzata da insufficiente produzione di latte che trae origine da cause non fondamentali per il determinismo delle mastiti o della MMA:

- inadeguato sviluppo della mammella;
- inadeguata o insufficiente produzione di latte;
- inadeguata omeoresi: incapacità del mantenimento delle dinamiche lattopoietiche.

I sintomi sono, evidentemente, correlati alla insufficiente produzione di colostro/latte per i suinetti con le ripercussioni già descritte per le mastiti e la sindrome MMA. La scrofa, però, non manifesta sintomi particolari e la frustrazione da parte del proprietario e dell'allevatore è elevata.

Il comportamento dell'allattamento della scrofa "problema" non differisce da quello di una scrofa "non problema" fino a 132 ore dopo il parto, mentre esiste una differenza tra alcune componenti del latte, in particolare un ridotto contenuto in lattosio. La scrofa con problemi alla nidiata presenta minore assunzione di acqua, minore temperatura cutanea sebbene la sua temperatura rettale non sia dissimile a quattro giorni prima del parto mentre risulta moderatamente più alta dopo 132 ore (49).

Inadeguato sviluppo della mammella

La mammella inizia a svilupparsi durante l'ultimo terzo di gravidanza e prosegue durante la lattazione (mammogenesi); le potenzialità dello sviluppo sono individuali e in alcuni animali questo potrebbe essere alla base dei problemi di accrescimento dei suinetti.

Inadeguata o insufficiente produzione di latte

La concentrazione di lattosio aumenta durante i primi giorni di lattazione e le scrofe con SSPD hanno un aumento più lento. Il ritardo di crescita delle nidiate è, in questo caso causato in una lattogenesi ritardata o da un incompleto sviluppo della ghiandola mammaria.

Inadeguata omeoresi

Una incapacità del mantenimento delle dinamiche lattopoietiche può essere correlata a:

- disturbi comportamentali, scarsa attitudine materna;
- deficit energetici;

- carenze idriche;
- disturbi nel bilancio di Calcio e Magnesio;
- disturbi ormonali;
- sostanze tossiche alimentari: ergotossine, perossidi;
- stipsi.

CONCLUSIONI

La sala parto potrebbe essere definita un vero e proprio laboratorio dove sperimentare, grazie al suo breve ciclo zootecnico, l'efficacia delle azioni intraprese sulla base delle indicazioni riportate in letteratura. La sala parto è senza dubbio il settore aziendale più costoso per metro quadrato da realizzare, e i costi sostenuti sono compatibili solo con alte rese zootecniche; assistiamo, però, a casi in cui il successo aziendale viene delegato in eccesso alle strutture *e questo aspetto può essere migliorato da un corretto rapporto tra Tecnici ed Allevatore.*

Le patologie infettive che minacciano la suinicoltura, gli andamenti dei mercati mondiali delle carni e dei prodotti trasformati, sono motivo di costante preoccupazione, ciononostante l'imprenditore che crede nell'allevamento suino non può che passare attraverso la consapevolezza che il successo aziendale deve prima di tutto essere sinonimo di economia d'impresa, di riduzione dei costi di esercizio, più che di una mera moltiplicazione dei capi prodotti. La sala parto, luogo dove sono persi il 10% circa dei soggetti nati in un solo mese della loro vita zootecnica, è l'ago della bilancia che può spostare in maniera netta il risparmio aziendale attraverso il mantenimento di un elevato benessere della scrofa e dei suinetti, unito al controllo delle malattie non strettamente influenzate dai parametri tecnologico-ambientali.

Bibliografia

1. Anil L., Anil S.A., Deen J. (2002) "Evaluation of the relationship between injuries and size of gestation stalls relative to size of sows". JAVMA, 65, 834-836;
2. Arey D. (1997) "Housing for the farrowing and lactating sow", Technical note n.454, Scottish Agricultural College, http://www.sac.ac.uk/info/External/Publications/TechNotes.asp;
3. Arey D.S., Petchey A.M., Fowler V.R. (1991) "The periparturient behaviour of sow in enriched pens and the effect of a pre-formed nest". Appl Anim Behav Sci, 31, 61-68;
4. Auldist D.E., Morrish L., Eason P., King R.H. (1998) "The influence of litter size on milk production of sow". Anim Sci, 67, 333;
5. Baccari F, Gayão A.L.B.A., Nunes J.R.V. (1993) "Effect of water cooling on growth rate of Large White-Landrace gilts during thermal stress". In: Collins E., Boon C. (eds), Livestock Environment IV. Fouth Intern. Symp., Univ of Warwick, Coventry, Enfgland. 6-9 July 1993. Publ. by ASAE, St Joseph, Michigan, USA, 889-894;
6. Ballarini G., Martelli P. (1993) "Clinica suina", ed. Ed agricola, pag.151-170;
7. Bará M.R., Cameron R.D.A. (1996) "The effect of faecal accumulation in farrowing crates and hand farrowing on the incidence of post-farrowing discharges and reproductive performance in sows". Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996, 574;
8. Barb C.R., Estienne M.J., Kraeling R.R., Marple D.N., Rampacek G.B., Rahe C.H.,

Sartin J.L. (1991) "Endocrine changes in sows exposed to elevated ambient temperature during lactation". Domest Anim Endocrinol 8, 117-127;
9. Baxter M.R. (1982) « The nesting behaviour of sows and its disturbance by confinement at farrowing ». In: Disturbed behaviour in farm animals, Bessai W. (ed.) Struttgart: Verlag Eugen Ulmer, 101-114;
10. Black J.L., Mullan B.P., Lorschy M.L., Giles L.R., (1993) "Lactation in the sow during heat stress" Livest Prod Sci 35, 153, 170;
11. Bonde M.K., Rousing T., Badsberg J.H., Sørensen J.T. (2003) "Association between lying-down behaviour problems and body condition, limb disorders and skin lesions of lactating sows housed in farrowing crates in commercial sow herds". Dias Report Animal Husbandry n.46, February 2003, 31-43;
12. Boyle L.A., Leonard F.C., Lynch P.B., Brophy P.(1999) "Prevalence and severity of skin lesions in sows housed individually during the production cycle". Irish Vet J, 52, 601-605;
13. Boyle L.A., , Leonard F.C.M., Lynch P.B., Brophy P. (2002) "Effect of gestation housing on behaviour and skin lesions of sows in farrowing crates". Appl Anim Behav Sci, 76, 119-134;
14. Brooks P.H., Burke J. (1998) "Behaviour of sows and piglets during lactation". In Verstegen M.W.A., Moughan P.J., Schrama J.W. (eds), The lactating sow, 1st edition, Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, 301-338;
15. Brooks P.H., Carpenter J.L. (1990) "The water requirement of growing-finishing pigs-theoretical and practical considerations". In: Haresign W., Cole D.J.A. (Eds.), "Recent Advances in Animal Nutrition", Butterworths, Nottingham Hills University, Hartnolls Ltd, Bodmin, Cornwall, UK, 115;
16. Bull R. P., Harrison P. C, Riskowski G. L., Gonyou. H. W. (1997) "Preference among cooling systems by gilts under heat stress". J Anim Sci, 75,2078-2083;
17. Chagnon M., D'Allaire S., Drolet R. (1991) "A prospective study of sow mortality in breeding herds". Can J Vet Res, 55, 180-184;
18. Clark P.C., McQuitty J.B. (1989) "Heat and moisture loads in farrowing rooms". Can Agric Engeneering, 31, 55-59;
19. Davies P., Moorrow M. (1994) "Shoulder ulcers in sows". Proceedings of the North Carolina healthy Hog Seminar, Greenville, NC · November 2, Fayettville, NC · November 4, 1994;
20. Davies P., Morrow W.E.M., Deen J. (1996) "Seasonality of shoulder ulcers in lactating sows". Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996, 504;
21. Davies P.R., Morrow M., Rountree W.E., Miller D.C. (1997) "Epidemiological evaluation of decubital ulcers in farrowing sows". J Am Vet Med Assoc 210, 1173-1178;
22. Deen J., Xue J. (1999) "Sow mortality in the US: an industry-wide perspective". Proceedings A.D. Leman Conference, 26, 91-94;
23. Deen J., Xue J.L., Irwin C., Geiger J. (2000) "A study of the epidemiology of sow mortality". Proceedings of the 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 289;
24. D.Lvo 26 marzo 2001, n.146, attuazione della direttiva n.98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti, G.U.R.I. 24/04/01, n.95;
25. D.Lvo 20 febbraio 2004, n.53, attuazione della direttiva n.2001/93/CE che stabilisce

le norme minime per la protezione dei suini, Suppl. Ord. n.30 alla G.U.R.I. 28/02/04 n.49;
26. Duran C.O., Walton J.R. (1998) "Survey of sow mortality in pig breeding herds". Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998, 235;
27. Edwards S.A., Lightfoot A.L. (1986) "The effect of floor type in farrowing pens on pig injury. II. Leg and teat damage of sows". Br Vet J, 142, 441-445;
28. Elmore R. G., Martin C.E., Berg J.N. (1978) "Absorption of Escherichia coli endotoxin from the mammary glands and utri of early postpartum sows and gilts", Theriogenology, (1978) Vol.10, n° 6, pag. 439-446;
29. Elsey F.W.H. (1971) "Nutrition in lactating sows". In Faulkner I.R. (eds), Lactation, 393-411, Butterworths, London;
30. Etienne M., Dourmad J.-Y, Noblet J. "The influence of some sow and piglet characteristics and of environmental conditions on milk production". In Verstegen M.W.A., Moughan P.J., Schrama J.W. (eds), The lactating sow, 1st edition, Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, 285-299;
31. Ewbank R. (1968) "An experimental demonstration of the effect of surface cooling upon the health of the bovine mammari gland". Vet Rec, 83, 685-686;
32. Fraser D., Patience J.F., Phillips P.A., McLeese J.M. (1990) "Water for piglets and lactating sows: quantity, quality and quandaries". In: Haresign W., Cole D.J.A. (Eds.), Recent Advances in Animal Nutrition", Butterworths, Nottingham Hills University, Hartnolls Ltd, Bodmin, Cornwall, UK, 115; 137-160;
33. Fraser D., Phillips P.A. (1989) "Lethargy and low water intake by sows during early lactation: a cause of low weight gain and survival?". Appl Anim Behav Sci, 24, 13-22;
34. Friend D.W. (1971) "Self selection of feeds and water by swine during pregnancy and lactation". J Anim Sci, 32, 658-666;
35. Furniss S. J. (1987) "Measurement of rectal temperature to predict mastitis, metritis and agalactia (MMA) in sows after farrowing", Preventive Veterinari Medicine, % (1987), 133-139;
36. Grant S.A., English P.R., McPerson (1998) "The effect of pleasant handling of sow and gilts prior to parturition and early lactation on behaviour, the process of parturition and piglet survival". Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998, 2;
37. Graves H.B. (1984) "Behaviour and ecology of wild and feral swine (Sus scrofa)". J Anim Sci, 58, 482-492;
38. Halgaard C. (1983) "Epidemiological factors in puerperal disease of sow", Nord. Vet. Med., 35, 161-174;
39. Harvey R. (2001) "Mastitis, metritis and agalactia", The pig journal (2001), 48, 61-65.
40. Holmes C.W. (1970) "Some thermal effects on the pig of the ingestion of liquid feed at various temperature". Anim Prod, 12, 485-492;
41. Houpt K.A. (2000) "Il comportamento degli animali domestici". Roma, EMSI, 191-203;
42. Hsia L.C. (1983) "High environmnental temperatures and pig production". In: Hsia L.C. (Editor), Environmental and housing for livestock. Proocedings of 1st International Conference on Environment and housing for Livestock, May 22-23,

1984, Pig Research Institute, Taiwan, Republic of China;
43. Jensen P. (1993) "Nestbuilding in domestic sows: the role of external stimuli". Anim Behav, 45, 351-358;
44. Johnston L.J., Orr D.E., Tribble L.F., (1997) "Effect of body condition and floor material on sow performance". J Anim Sci, 64, 36-42;
45. Kildour R., Dal ton C. (1984) « Farrowing pens and behavoiur". Livestock Behavoiur: A Practical Guide, 150-191. London: Granada;
46. Kim S.W., Easter S.A., Hurley W.L. (2001) "The regression of unsucled mammary glands during lactation in sows: the influence of lactation stage, dietary nutrients and litter size". J Anim Sci, 79, 2659-2668;
47. King R.H. (1991) "Nutrition of sows during lactation dependent on milk yield". Feedstuffs, October 28, 13-15;
48. King R.H., Toner M.S., Dove H. (1989) "Pattern of milk production in sow". IN: Battheram E.S. (eds) Manipulation of pig Production II, 98, Australasian Pig Association, Attwood;
49. Klopfenstein C. (2003) "Variation temporelle des caractéristiques comportamentales et physiologiques des truies qui allaitent les portées à croissance afible et normale en période du péripartum, Thèse de Doctorat, Université de Montréal, Montréal;
50. Klopfenstein C., Farmer C., Martineau G.P. « Disease of the mammary glands », in Disease of swine, 9th ed., pag. 57-85
51. Ladewig J., Kloeppel P., Kallweit E. (1984) "A case of "reversed cannibalism": the piglets damaging the sow". Ann Rech Vet, 15 (2), 275-277;
52. Lewis E., Boyle L., Lynch B., Brophy P., O'Doherty J. (2002) "Effect of different floor types in farrowing crates on sow welfare". Proc. 36th Int. ISAE Congress, The Netherlands, 6-10 August 2002, 152;
53. Mahan D.C. (1969) "Nitrogen and water metabolism in the lactating sow". PhD Thesis, University Illinois, Urbana, IL;
54. Makkink C.A., Schrama J.W. (1998) "Thermal requirements of the lactating sow". In Verstegen M.W.A., Moughan P.J., Schrama J.W. (eds), The lactating sow, 1st edition, Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, 271-283;
55. McGlone J.J., Stansbury W.F., Tribble L.F. (1988) "Management of lactating sows during heat-stress: effects of water drip, snout coolers, floor type and a high energy density diet". J Anim Sci, 66, 885-891;
56. Messias de Bragança M., Mounier A.A., Hulin J.C., Prunier A. (1997) « la sous-nutrition explique-t-elle les effets d'une temperature ambiante élevée sur les performances des truies ? », Journ rech porcine 1997, France
57. Mount L:E: (1979) "Adaptation to Thermal Environment. Man and his productive animals" Edward Arnold (Publishers) Ltd. London, UK., 333;
58. Muirhead M.R., Alexander T.J.L. (1997) "Managing Pig Health and the Treatment of Disease", Shieffield, United Kingdom, 5M Enterprises Ltd., 234-247;
59. Murphy J.P., Nichols D.A., Robbins F.V. (1989) "Drip cooling of lactating sows". Pigs, (May/June 1989), 5 (3), 8-9;
60. Phillips P.A., Fraser D., Thompson B.K. (1991) "Preference by sows for a partially enclosed farrowing crate". Appl Anim Behav Sci, 32, 35-43;
61. Perestrelo R., Perestrelo H., Madec F., Tillon J. P. (1994) "Prevention of metritis -mastitis-agalaxia sindrome in sows", Vet Res (1994) 25, 266-270;

62. Quemere P., Degroote G., Degroote S., Stoffaes J., Willwquet F. " Types de sol et lésions podales chez les truies et les porcetes". Journées Rech Porcine en France, 20, 123-132 ;
63. Quiniou N., Noblet J., Dubois S., Renaudeau D. « Caractérisation des effect del l'augmentation de la température ambiante sur les performances des truies en lactation" 31emes Journèes de la reserche porcine en France, Paris (1999), 31 ; 133-138;
64. Schouten W.G.P. (1991) " Effects of rearing conditions on the behaviour of gilts around farrowing". Appl Anim Behav, 17, 367;
65. Stangel G., Jensen P. (1991) "Behaviour of semi-natural kept sows and piglets (except suckling) during 10 days post partum". Appl. Anim. Behav. Sci., 31, 211-227;
66. Stansbury W.F., McGlone J.J, Tribble L.F. (1987) "Effects of season, flooor type, air temperature and snout coolers on sow and litter performance". J Anim Sci 65, 1507-1513;
67. Tabajara P., Soares M., Richard A. (2000) "Genital status and litter performance of sows treated with antibiotics to control MMA", Proc IPVS Olanda, pag. 473;
68. Thodberg K., Sørensen M. T. (2006) "Mammary development and milk production in the sow: effects of udder massage, genotype and feeding in late gestation", Livestock science, 101 (2006) 116-125;
69. Van Putten G. (2000) "An ethological definition of animal welfare with special emphasis on pig behaviour". In: Hovi M., Trujillo G. (eds.), Proc. Of the 2nd NAHWOA Workshop, Cordoba 8-11 January 2000;
70. Vestergaard K., Hansen L.L. (1984) "Tethered versus loose sows-Ethological observations and measures of productivity. 1. Ethological observations during pregnancy and farrowing". Annales de Recherche Vétérinaire 15, 245-256;
71. Welch A.R., Baxter M.R. (1986) "Responses of newborn piglets to thermal and tactile properties of their environment". Appl Anim Behav Sci, 15, 203-215;
72. Whittemore C.T., Cosgrove J.R., Aherne F.X., FoxCroft G.R. (1997) "Pattern of fed intake and associated metabolic and endocrine changes differentially affect postweaning fertility in primiparous lactating sows". J Anim Sci, 75, 208-216;
73. Widosky T.M., Curtis S.E. (1990) "The influence of straw, cloth tassel, or both on the pre-partum behaviour of sows". Appl Anim behav Sci, 27, 53-71;

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

amodo.it

JANSSEN
ANIMAL HEALTH

Divisione della Janssen-Cilag Spa

MILANO • Via Michelangelo Buonarroti, 23 • 20093
Cologno Monzese • Tel. 0225101 • Fax 022510500

JANSSEN
ANIMAL HEALTH

DESCRIZIONE DI 8 EPISODI DI CONGIUNTIVITE MUCOPURULENTA IN SUINI ALL'INGRASSO

MUCOPURULENT CONJUNCTIVITIS 8 OUTBREAKS IN FATTENING PIGS

FRANCESCO SALVINI[1], GIOVANBATTISTA GUADAGNINI[1], LORIS ALBORALI[2]

[1]***Medico Veterinario, Brescia;***
[2]***IZS Lombardia e Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Brescia.***

Parole chiave: congiuntivite, *Chlamydia*, suino

Key Words: conjunctivitis, *Chlamydia*, pig

Riassunto. Nel presente lavoro vengono presi in considerazione suini da ingrasso con congiuntivite muco purulenta, provenienti da 8 allevamenti della pianura padana.
In ogni allevamento, sono stati campionati 2 o 3 suini provenienti da differenti box con congiuntivite in fase acuta.
Il prelievo è stato eseguito mediante l'utilizzo di tamponi per l'esame batteriologico, per l'esame virologico e per l'esame per *Chlamydia*. E' stato eseguito un prelievo ematico per la ricerca degli anticorpi contro Influenza virus (H1N1, H1N2, H3N2), PRRSV, *Chlamydia*; inoltre, tramite la tecnica PCR su siero di sangue, è stato ricercato solo il PRRSV.
Parallelamente è stato compilato un questionario riguardante le strutture di ricovero, l'alimentazione e la qualità dell'aria. La *Chlamydia* è stata messa in evidenza da tampone oculare nel 76,4% dei casi e potrebbe essere la principale causa di congiuntivite muco purulenta, lesione che può essere aggravata da ambienti con scarsa qualità dell'aria.

Abstract. In this work we considered fattening pigs with mucopurulent conjunctivitis, selected from 8 herds located in Pianura Padana. We sampled 2 or 3 pigs with conjunctivitis in acute phase, selected from different batches. We sampled pigs with swabs for bacteriologic exam, for virologic exam and for the detection of *Chlamydia*. We collected also a blood sample for the serology and for PCR. We searched antibodies for Influenza virus, PRRSV and for *Chlamydia*, while PCR from serum was used only to detect PRRSV.
During sampling, we compiled a set of questions about the farm's structure, alimentation and the quality of the air.
Chlamydia was detected in 76,4% of the swabs analysed: it could be the most important cause of the mucopurulent conjunctivitis. The bad air quality can make worse the ocular lesions.

INTRODUZIONE

La *Chlamydia* è un batterio Gram negativo, intracellulare obbligato, responsabile di varie patologie negli animali e nell'uomo. Le specie di interesse in patologia suina sono *Chlamydophila abortus, Chlamydophila pecorum e Chlamydia suis* (Everett et al., 1999).
Le manifestazioni cliniche più frequenti nella specie suina sono a carico dell'apparato respira-

torio (Harris et al., 1984), enterico (Pospischil et al., 1987) e riproduttivo (Eggemann et al., 2000) Sono stati dimostrati casi di artrite, pericarditi (Taylor 2006) e casi di congiuntivite che si presenta nel suino in forma muco purulenta accompagnata da marcata iperplasia dei follicoli linfatici congiuntivali (Bettini 2002).
Un aumento di casi di congiuntivite in alcuni allevamenti della pianura padana ha stimolato un approfondimento sulla causa e sui fattori favorenti la manifestazione clinica.

Foto 1: suino con congiuntivite muco purulenta bilaterale / pig with bilateral mucopurulent conjunctivitis

MATERIALI E METODI

L'indagine conoscitiva si è svolta presso 8 allevamenti da ingrasso della pianura padana.
In tutti gli allevamenti analizzati, gli animali presentavano alla visita clinica una evidente forma di congiuntivite muco purulenta, generalmente bilaterale, in vari stadi evolutivi.
La manifestazione clinica è stata rilevata in animali di peso variabile tra i 50 e i 120 kg, generalmente in assenza di altre forme morbose evidenti.
Alla visita clinica di massa sono stati rilevati soggetti con congiuntivite, in una percentuale inferiore al 10%. Tra tali soggetti sono stati presi in considerazione solo i suini con evidente lesione congiuntivale in fase acuta e campionati in un numero di 2/3 capi per allevamento.
I soggetti, sempre provenienti da box differenti, sono stati catturati singolarmente mediante l'utilizzo del torcinaso e sottoposti a campionamento mediante l'ausilio di tamponi e prelievi ematici.
L'esecuzione del prelievo mediante tampone oculare ha riguardato entrambi gli occhi.
Sono stati utilizzati 3 differenti tamponi di trasporto: uno posto in soluzione fisiologica e destinato all'esame batteriologico, uno inserito in terreno contenente antibiotici idoneo per esame virologico e un terzo terreno specifico per essere utilizzato per PCR per ricerca Chlamydia.
I campioni sono stati prontamente conferiti alla Sezione Diagnostica di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Foto 2: Materiale utilizzato per campionamento / Sampling material

Le ricerche di laboratorio comprendevano un esame batteriologico generico, la ricerca di virus influenzale, mediante l'ausilio di uova embrionate, colture cellulari e PCR e la ricerca della *Chlamydia* mediante l'utilizzo della PCR/RFLP da apposito tampone con specifico terreno di trasporto.
I soggetti campionati sono stati sottoposti a prelievo ematico, dal quale sono stati ricercati anticorpi per l'influenza mediante l'inibizione dell'emoagglutinazione, anticorpi per PRRSV mediante l'utilizzo di un kit Elisa commerciale (Idexx), anticorpi verso *Chlamydia spp*. mediante fissazione del complemento e presenza di genoma virale di PRRSV tramite PCR.
Al momento del campionamento è stata compilata una scheda riguardante i principali parametri ambientali e zootecnici: tipo di pavimentazione, fossa, ventilazione, tipo di alimentazione, disponibilità di acqua ed infine una valutazione non strumentale della qualità dell'aria con attribuzione di un punteggio da 1 a 5.

RISULTATI

L'esame batteriologico dei 17 tamponi oculari eseguiti ha messo in evidenza 5 campioni negativi e 12 positivi, con positività singole o multiple. *Streptococcus spp* è stato isolato 10 volte, *Staphylococcus spp* 5 volte e *Pseudomonas spp.* una sola volta.
All'esame virologico per la ricerca di virus influenzale, un solo campione è risultato positivo tramite PCR (TAB1), mentre gli esami culturali sono risultati negativi.
La ricerca tramite PCR per *Chlamydia* ha evidenziato 13 positività su 17 campioni analizzati (76,4%).
Tutte le positività sono appartenenti alla specie *Chlamydia suis*.
Per quanto riguarda le aziende 6 su 8 sono risultate positive all'indagine di laboratorio (TAB1).

Tabella1: Risultati PCR da tamponi / PCR results from swabs

Allevamento	1		2		3		4		5		6			7		8	
PCR INFLUENZA	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
PCR CHLAMYDIA	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	P

Le indagini sui campioni ematici hanno evidenziato positività sierologica per i ceppi influenzali H1N1 e H3N2 su 4 campioni rappresentativi di 2 aziende. L'indagine sierologica per *Chlamydia* non ha evidenziato campioni positivi.
L'indagine sierologica per PRRSV ha evidenziato 16 campioni positivi con valori S/P oscillanti da 0,7 a 3,8, mentre la ricerca di genoma virale mediante PCR ha evidenziato 2 aziende positive su 8 (TAB 2).

Tabella 2: Sierologia e PCR per PRRS da sangue / Serology and PCR for PRRS from serum sample

ALLEV	1	2	3	4	5	6	7	8
S/P	1,8	2,8	3,8	0,7	1,2	1,1	0,8	N
	2,3	1,6	1,3	1,0	1,3	0,8 1,1	2,8	1,3
PCR	P	N	N	P	N	N	N	N

L'analisi ambientale degli allevamenti ha messo in evidenza le presenza di pavimento fessurato in 6 allevamenti mentre 2 presentavano pavimento pieno con parchetto coperto. Tutti i capannoni con pavimento fessurato presentavano deposito sottostante di liquame. La ventilazione è risultata naturale in tutti i capannoni, così come l'alimentazione a bagnato. L'acqua era a disposizione tramite succhiotto in uno solo degli 8 allevamenti analizzati.
Per quanto riguarda la valutazione della qualità dell'aria in 2 allevamenti è stato attribuito il massimo punteggio (5) a significare una pessima qualità dell'aria; un solo allevamento ha presentato un punteggio intermedio (3), mentre negli altri 5 allevamenti è stata rilevata una buona qualità dell'aria.

CONCLUSIONI

Le analisi eseguite negli 8 allevamenti hanno evidenziato una significativa positività alla ricerca di *Chlamydia* dai tamponi oculari a fronte della negatività sierologica riscontrata nei confronti del medesimo patogeno nei campioni ematici degli stessi soggetti.
L'isolamento di *Streptococcus spp.* e *Staphilococcus spp.*, sebbene consistente, può essere considerato nell'ambito di infezioni batteriche secondarie associate a patogeni presenti normalmente sulla cute di suino.
Non sembra esserci stretta correlazione tra la positività alla PCR per PRRSV nel sangue e la manifestazione clinica oculare, in quanto non si rilevavano segni clinici riferibili a

PRRS ne' nei gruppi positivi ne' in quelli negativi. Tale dato trova conferma grazie alla sierologia poiché il 94% dei soggetti presenta positività anticorpale.
Per quanto riguarda i parametri ambientali, l'unico aspetto che può essere considerato rilevante è la qualità dell'aria; infatti delle 5 aziende con buona qualità dell'aria (punteggio pari a 2), 2 sono risultate negative alla ricerca per *Chlamydia* da tampone oculare. Va considerato che in una delle due aziende negative era stato effettuato da circa 10 giorni un trattamento con doxiciclina per una sindrome respiratoria.
Alla luce dei risultati ottenuti, riteniamo che la causa principale della forma clinica oculare da noi osservata sia da individuare in *Chlamydia* in accordo con quanto precedentemente espresso da Autori (Merialdi et al., 2003). Inoltre la gravità della manifestazione clinica è risultata essere influenzata dalla
qualità dell'aria e dalle infezioni batteriche secondarie.

Bibliografia:

Bettini G. (2002) in Marcato P.S. "Patologia Sistematica Veterinaria" 1a ed., Bologna, Edagricole

Eggemann G., Wendt M., Hoelzle L.E., Jager C., Weiss R., Failing K. (2000) "Prevalence of Chlamydia infection in breeding sowsand their importance in reproductive failure" Dtsch Tierarztl Wochenschr 2000, 107,(1), 3-10

Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. (1999) "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae 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 the organism" Int. J. Sys. Bacteriol. 49, 415-440

Harris J.W., Hunter A.R., Martin D.A. (1984) "Experimental chlamydial pneumonia in pigs" Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 7, 19-26

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

Pospischil A. and Wood R.L. (1987) "Intestinal Chlamydia in pigs" Veterinary Pathology 24, 568-570

Taylor D.J. (2006) in Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing

CON I NOSTRI PRODOTTI SEI PIU' SICURO CHE NESSUNO RIMANGA INDIETRO.

In Intervet/Schering-Plough Animal Health siamo al tuo fianco per garantirti un allevamento in salute e con crescite uniformi. Assicurare elevati tassi di crescita e grande uniformità in tutto l'allevamento, attraverso la migliore gestione sanitaria, è fondamentale per il profitto di ogni allevatore. Dalla PRRS alla Malattia di Aujeszky il nostro portafoglio offre prodotti di provata efficacia. Attraverso i consigli dei nostri esperti siamo in grado di offrirti soluzioni velocemente, guadagnando ogni giorno la fiducia dei medici veterinari in tutto il mondo.

Intervet
Schering-Plough Animal Health

intervet.it

GRIGLIA S.P.E.S.: VALUTAZIONE AL MACELLO DI POLMONI APPARTENENTI A PARTITE DI SUINI PROVENIENTI DA DUE ALLEVAMENTI CON BASSA SIEROPREVALENZA DA *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

S.P.E.S. GRID: SLAUGTHERHOUSE LUNGS EVALUATION OF PIG BATCHES FROM TWO *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* LOW SEROPREVALENCE HERDS

B. SPAGGIARI[1], G.MERIALDI[1], P.BONILAURI[1], A.LUPPI[1], R.LEONELLI[1], M.BONCI[2], G.P.SANDRI[3], M.DOTTORI[1], GOZIO S.[4], P.MARTELLI[5]

[1] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Sezione di Reggio Emilia***
[2] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Treviso***
[3] ***Agricola Tre Valli – Gruppo Veronesi, Quinto di Valpantena, Verona, Italia***
[4] ***Intervet International BV. Part of Intervet/Schering-Plough Animal Health***
[5] ***Università degli studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria***

Parole chiave: Pleuriti, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, macello, punteggiatura

Key words: Pleurisy, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, slaughterhouse, scoring

Riassunto. La S.P.E.S. (*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*), sistema di valutazione delle lesioni pleuriche croniche su polmoni osservati in catena di macellazione, è stata applicata a 5 partite di suini provenienti da due allevamenti caratterizzati da bassa o assente sieroprevalenza per *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), con sporadiche sieroconversioni, senza diffusione del fenomeno e con assenza di isolamento del patogeno durante tutto il periodo dello studio. Il sistema di valutazione, che si basa sull'assegnazione di un punteggio da 0 a 4, in base alla presenza, estensione e posizione delle lesioni pleuriche presenti sui 2 polmoni di un singolo animale, ha mostrato come, negli allevamenti in esame, 3 partite fossero caratterizzate da animali con lesioni pleuriche non ascrivibili ad App (punteggio non superiore a 1), mentre le altre due partite presentassero ognuna, un solo soggetto con punteggio pari a 2 e 3 rispettivamente. Quest'ultimo rilievo si poneva tuttavia, in un contesto di totale assenza di lesioni pleuriche riferibili ad App nel resto della partita. L'indice APPI (*Actinobacillus pleuropneumoniae Index*), che tiene conto sia della frequenza sia della media delle lesioni causate da App, si posiziona fuori scala rispetto ai dati ottenuti in un precedente studio in un gruppo di aziende italiane con problemi di patologia respiratoria.
Anche in questo caso il sistema S.P.E.S. ha dimostrato notevole affidabilità, andando a confermare che le lesioni pleuriche croniche dorso-caudali rilevabili al macello sono per lo più l'esito di pleuropolmoniti provocate da App.

Abstract. *S.P.E.S. (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System), a chronic pleural lesions evaluation system in swine lungs during slaughter line, was applied to five swine batches from two Actinobacillus pleuropneumoniae (App)-low seroprevalence herds. The herds had sporadic or not*

seroconversions, without App infection diffusion and bacterial isolation during the period considered. The evaluation system, consisting in a score ranging from 0 to 4 on the basis of pleural lesions presence, extension and location on the two lungs of an animal, was applied to the considered herds and showed that three batches had animals with pleural lesions scored < 2 not referable to App, and in two batches only one animal, for each batch, was scored 2 and 3 respectively, in a general context of absence of pleural lesion in the remaining batch subjects. APPI index (Actinobacillus pleuropneumoniae Index), which express both App lesions frequency and score mean, resulted to be out of range compared to data obtained in a previous study on a group of Italian herds affected by respiratory disease. In conclusion, also in the present study S.P.E.S. has proved to be a highly reliable evaluation system and has confirmed that chronic pleural dorsocaudal lesions detected at slaughter are mostly a consequence of App induced pleuropneumonia.

INTRODUZIONE

La malattia respiratoria nel suino rappresenta un problema molto importante per l'industria suinicola italiana, che provoca importanti perdite economiche dovute principalmente alla riduzione della conversione dell'alimento negli animali ammalati. Numerose infezioni batteriche, tuttavia, non si risolvono completamente con la remissione dei sintomi, esitando in lesioni croniche che persistono generalmente fino alla macellazione e che soprattutto nelle pleuriti raggiungono la loro massima espressione, influenzando negativamente le performances di crescita (1, 2, 3). Le lesioni che interessano i lobi cranioventrali sono generalmente secondarie a polmonite enzootica o ad altre patologie bronco-polmonari che colpiscono i lobi craniali e mediani, mentre le lesioni pleuriche che interessano i lobi diaframmatici sono generalmente causate da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) ed in minor misura da *Haemophilus parasuis*, Streptococchi e *Mycoplasma hyorinis* (4).
La misurazione con il metodo S.P.E.S. (*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*) (5, 6, 7) consente di valutare le lesioni pleuriche in base a localizzazione, aspetto ed estensione. Attraverso l'elaborazione statistica dei dati registrati, il metodo consente di misurare non solo l'entità del danno, ma di identificare anche la distribuzione in classi all'interno del campione e restituire il dato in forma grafica facilmente leggibile.
Il presente studio si ripropone di presentare i risultati ottenuti dall'applicazione della griglia S.P.E.S. nella valutazione delle lesioni pleuriche in 5 partite di macellazione provenienti da due allevamenti caratterizzati da bassa sieroprevalenza di App e da assente isolamento del patogeno. Inoltre ha lo scopo di contribuire alla validazione del sistema di valutazione delle pleuriti suine in sede di macellazione, e segue quelli precedentemente presentati dagli stessi autori nell'applicazione della griglia S.P.E.S. su partite di suini provenienti da allevamenti con problemi di patologia respiratoria sostenuta anche da App, con e senza profilassi vaccinale nei confronti di quest'ultimo (8, 9, 10).

MATERIALI E METODI

Sono state valutate le lesioni pleuriche di 604 polmoni appartenenti ad altrettanti suini di peso compreso fra 160 e 180 Kg, suddivisi in 5 partite. Tre partite di queste provenivano da un allevamento a ciclo chiuso di 600 scrofe (allevamento A) dove gli animali all'ingrasso erano stabulati in capannoni con capienza globale di 3500 capi e due partite da un secondo allevamento da ingrasso (sito 3 in un sistema di produzione a tre siti), consistente in due

capannoni, per una capacità totale di 1800 capi, che lavora in regime di "tutto pieno-tutto vuoto" (allevamento B).
Per ogni partita sono stati raccolti i dati relativi ai piani di profilassi vaccinale, all'eventuale presenza di sintomatologia respiratoria e ai risultati del monitoraggio sierologico.
Durante il periodo dello studio gli allevamenti sono stati sottoposti ad indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi nei confronti di PRRSV (ELISA indiretta IDEXX), di SIV (H1N1, H3N2 e H1N2) tramite test d'inibizione dell'*emoagglutinazione*, di *Mycoplasma hyopneumoniae* (ELISA indiretta IDEXX) e di PRV (ELISA competitiva gE, IDEXX). Per la ricerca di anticorpi contro *Actinobacillus pleuropneumoniae* sono stati impiegati 3 test ELISA indiretta, uno basato sull'impiego dell'antigene ricombinante ApxIV (ELISA indiretta, Bommeli), uno in grado di identificare i sierotipi 1,2,4,7,9,11 (ELISA indiretta Vetquinol) e l'ultimo in grado di identificare solo i sierotipi 2 e 9 (Kit Tre Valli-APP 2-9). Gli esami sierologici sopraccitati sono stati eseguiti in modo da poter inquadrare la situazione sanitaria degli allevamenti durante tutto il ciclo produttivo.
Il metodo S.P.E.S. precedentemente proposto e presentato (6,7,8,9,10) si basa sull'assegnazione di un punteggio da 0 a 4 in base alla presenza, all'estensione ed alla posizione delle pleuriti osservate sui 2 polmoni di ogni animale direttamente in catena di macellazione (tabella 1).

Tabella 1: Griglia di valutazione S.P.E.S. in sintesi.
Table1: The S.P.E.S. grid for chronic pleurisy (CP) score.

Punteggio	Lesione
0	Assenza di lesione
1	Lesioni pleuriche di tipo aderenziale tra le porzioni cranioventrali dei lobi anteriori intermedi e diaframmatici, oppure aderenza di modesta entità monolaterale al margine ventrale di un lobo diaframmatico
2	Lesione/i aderenziale/i di lieve o media estensione localizzate ad uno dei lobi diaframmatici con carattere di cronicità (lacinie e fibrina in assenza di essudazione ed abbondante tessuto di granulazione)
3	Lesioni dello stesso tipo 2, ma bilaterali; lesioni monolaterali ad un lobo diaframmatico con notevole estensione
4	Lesioni gravi per estensione (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici) e/o per acuzie (essudazione ed abbondante tessuto di granulazione)

Per ogni partita la griglia S.P.E.S. è in grado di fornire sostanzialmente due tipi di informazioni: il valore medio S.P.E.S. (SPES) che permette di ottenere un punteggio che descrive in generale lo stato della partita, e l'indice APPI (*Actinobacillus pleuropneumoniae* Index) che fornisce informazioni sulla prevalenza e sulla gravità delle pleuriti dorso-caudali, fortemente indicative di precedenti pleuropolmoniti da App.
I due indici vengono calcolati secondo le seguenti formule:
SPES= somma dei singoli score pleurici/numero di polmoni valutati
APPI = frequenza delle lesioni riferibili ad App (numero di animali con score 2,3,4/numero totale di soggetti sottoposti a valutazione S.P.E.S.)*media degli score S.P.E.S. ottenuti (considerando score 2,3,4) e riferibili ad App. Ad esempio, ipotizzando la valutazione S.P.E.S. di 10 animali con il seguente punteggio: 0,0,0,0,1,1,1,2,3,4, la frequenza delle lesioni riferibili ad App si ottiene pertanto applicando la formula precedente (3/10*(2+3+4)/3)=0.9.

RISULTATI

I dati anamnestici raccolti hanno evidenziato come in entrambi gli allevamenti venisse praticata la vaccinazione per malattia di Aujezsky, a cui si associava, nell'allevamento B, quella per influenza. La sintomatologia respiratoria, valutata in entrambe le aziende, costituiva un problema del tutto marginale, con perdite totali (mortalità e scarti) inferiore al 3%.
Nell'allevamento A i risultati del monitoraggio sierologico hanno evidenziato una costante assenza di risposta anticorpale nei confronti del virus della PRRS e della malattia di Aujeszky, ed una sieropositività per *Mycoplasma hyopneumoniae* costantemente presente durante tutto il periodo dello studio, con valori massimi e minimi che andavano dall'8 all'80% degli animali testati. La sierologia nei confronti dei virus influenzali del suino ha dato sempre esito negativo per quanto riguarda la ricerca di anticorpi nei confronti del sottotipo ed H1N2, mentre si sono osservati, tra aprile e luglio 2007, due episodi di sieroconversione nei confronti del sottotipo H1N1 ed H3N2. Per quanto riguarda la sierologia nei confronti di App si sono verificate, durante tutto il periodo dello studio, sporadiche siero conversioni (5-10%). Tali fenomeni non sono mai stati accompagnati da aumento della sintomatologia respiratoria e della mortalità in allevamento.
Nell'allevamento B sono state osservate sieroprevalenze sovrapponibili all'allevamento A per quanto riguarda *Mycoplasma hyopneumoniae*, mentre una diffusa sieropositività è stata riscontrata per il virus della PRRS (la sieroconversione era avvenuta all'ingrasso, poco prima della macellazione). Le indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi nei confronti di PRV e di App sono invece risultate sempre costantemente negative. In questo caso l'indagine sierologica nei confronti di App ha visto l'impiego del Kit Tre Valli-APP 2-9.
I risultati relativi alla valutazione S.P.E.S. per ogni allevamento sottoposto allo studio sono visualizzati nel grafico 1 e nella tabella 2.

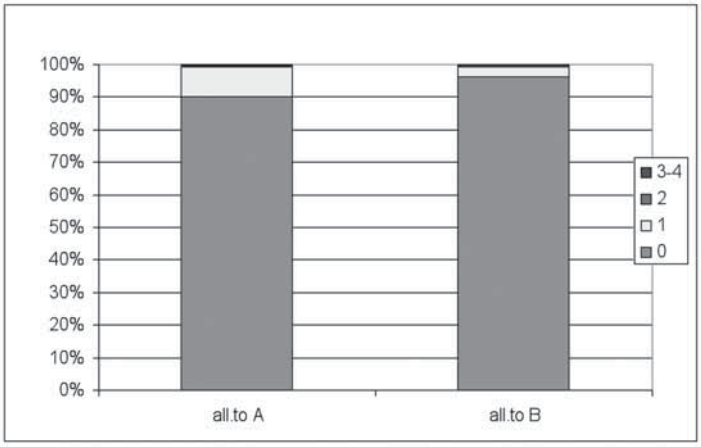


Grafico 1. Distribuzione cumulata in colonna di tutti i polmoni analizzati tramite griglia S.P.E.S. nell'allevamento A (3 partite n=344) e nell'allevamento B (2 partite n=261).

Figure 1. Distribution of pleural scores (S.P.E.S. grid) of lungs belonging to pigs of herd A (3 batches n=344) and B (2 batches n=261).

	Partite	N	SPES	APPI	PLEURITI	PLEURITI DC
Allevamento A	3	344	0.11	0.01	9.9%	0.8%
Allevamento B	2	261	0.06	0.03	3.8%	0.6%

Tabella 2. Risultati dell'applicazione della griglia S.P.E.S. e del calcolo degli indici SPES ed APPI nei 2 allevamenti.
Table 2. S.P.E.S grid results and correlations among SPES/APPI values into two herds

Nella partita n°1 dell'allevamento A, 19 animali su 176 hanno mostrato lesioni pleuriche croniche valutate di grado 1, nessun polmone ha presentato punteggio superiore a 1, a cui corrisponderebbe la presenza di pleurite dorso-caudale ascrivibile a lesione cronica da App. Nella partita 2, composta da 101 animali, un solo polmone ha presentato punteggio pari a 3, mentre per 14 soggetti le lesioni pleuriche sono state valutate di grado 1. Nella partita n°3 dello stesso allevamento, un solo polmone su 67 ha presentato un punteggio uguale a 2. Questo risultato si pone tuttavia come dato isolato in un contesto di totale assenza di lesioni pleuriche all'interno della partita stessa. In entrambe le partite 1 e 2 dell'allevamento B, le lesioni riferibili a pleuriti sono state osservate in 5 soggetti, di cui quattro con lesioni di lieve entità localizzate cranio-ventralmente (grado 1). In un soggetto è stata rilevata una pleurite fibrino-purulenta acuta dovuta ad infezione da *Arcanobacterium piogenes*, non conteggiata nella griglia S.P.E.S.
Il calcolo dell'indice APPI (tab.2), descritto precedentemente, mostra come tutte le partite descritte si posizionino fuori scala rispetto alla distribuzione delle partite analizzate in un precedente lavoro (9, 10) in cui era stata attuata la valutazione delle lesioni pleuriche di 4689 suini, provenienti da 46 diverse aziende e suddivisi in altrettante partite. Nello studio sopraccitato il 26% dei suini considerati presentava lesioni pleuriche croniche dorso caudali riferibili ad infezione da App, di cui il 17,3% con punteggio 2, il 7,3% con punteggio 3 ed l'1,6% con punteggio 4.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati dell'applicazione della griglia S.P.E.S. ad allevamenti a bassa o assente sieroprevalenza per App hanno evidenziato l'elevata specificità del metodo nell'identificare o escludere lesioni pleuriche croniche riferibili a precedenti pleuropolmoniti da App.
Il presente studio rafforza e completa i risultati ottenuti in precedenti lavori, in cui allevamenti con assenza di sintomatologia respiratoria avevano riportato punteggi mediamente minori, in modo statisticamente significativo, rispetto a quelli con sintomatologia (7). Allo stesso modo, allevamenti con anamnesi storica di isolamento per App, avevano ottenuto risultati mediamente maggiori e statisticamente significativi (7,9,10). Nel caso riportato nel presente lavoro, all'assenza di sintomatologia clinica si associa la bassa o assente sieroprevalenza per App, ed un indice APPI prossimo allo 0.
Questo ulteriore contributo dimostra l'attendibilità del sistema di valutazione delle pleuriti, permettendo l'ottenimento di un dato numerico correlabile con l'estensione e la gravità delle lesioni osservate in catena di macellazione. Il metodo, rapido ed economico, si completa con l'osservazione delle lesioni al macello e non richiede l'asportazione dei visceri dalla catena di macellazione.

Alla luce dei risultati ottenuti la griglia SPES si propone come utile strumento nella valutazione delle problematiche legate alla circolazione di App sia in allevamenti a bassa o assente prevalenza, sia in aziende in cui il problema si presenta in forma sub-clinica o clinica.

Bibliografia:

1. Christensen N.H. (1998) A unified scoring scheme for pleurisy in slaughter pigs. Proceedings of the 12th IPVS Congress, Birmingham, England, July 5-9. 1998, p. 255.
2. Mousing J., Lybye H., Barfod K., Meyling A., Ronsholt L., Willeberg P. (1990) Chronic pleurisy in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. Prev. Vet. Med. 9: 107-119.
3. Gozio S., Cominotti F., Bonilauri P., Dottori M., Poggiali M., Vezzali L. (2006) The effect of Porcilis App on rearing on rearing results and slaughterhouse examinations in a typical heavy pig herd in northern Italy. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006-Volume 2: p 303
4. Sørensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006) Diseases of the respiratory system. In: Diseases of Swine, 9th ed., p. 149-177.
5. Pinton A.M., Mercy A.R., Backstrom L., Dial G.D. (1993) Disease surveillance at slaughter. In: Diseases of Swine, 7th ed., p. 969-987.
6. Dottori M., Nigrelli A.D., Bonilauri P., Merialdi G., Gozio S., Cominotti F. (2007) S.P.E.S. (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). Proposta per un nuovo approccio ispettivo delle lesioni polmonari in sede di macellazione. Atti del XXXIII convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Modena, 29-30 Marzo 2007, p. 141-148.
7. Dottori M., Nigrelli A.D., Bonilauri P., Merialdi G., Gozio S., Cominotti F. (2007) Proposta per un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione. La griglia S.P.E.S. (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). Large Animal Review, 13:161-165.
8. Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Nigrelli A., Martelli P. (2008) Monitoraggio della patologia respiratoria attraverso la valutazione delle lesioni polmonari, pleuriche e della sierologia. Atti XXXIV Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, Salsomaggiore Terme (Parma), 13-14 Marzo 2008, p. 319-326.
9. Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Nigrelli A., Martelli P. (2008) Monitoring respiratory disease at slaughterhouse using lung and pleural lesions score and serology. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, June 22-27, 2008; vol. 2: p. 380.
10. Dottori M., Bonilauri P., Merialdi G., Nigrelli A., Martelli P. (2008) Monitoring chronic pleurisy due to Actinobacillus pleuropneumoniae at slaughterhouse by a newly implemented scoring system. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, June 22-27, 2008; vol. 2: p. 230.

TUBERCOLOSI NEL SUINO NERO DEI NEBRODI: VALUTAZIONE DEL RISCHIO E STUDIO CASO – CONTROLLO

TUBERCULOSIS IN NEBRODI'S BLACK PIG: RISK ASSESSMENT AND CASE-CONTROL STUDY.

MICHELE FIASCONARO, VINCENZO ARONICA, ELENA RAPPAZZO, MIRIAM RUSSO, VINCENZO DI MARCO.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Barcellona P.G. (Messina)
Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italia

Parole chiave: tubercolosi, suino Nero dei Nebrodi, odds ratio.

Key words: tuberculosis, Nebrodi's black pig, odds ratio

Riassunto. Gli autori descrivono uno studio su come le diverse tipologie di allevamento di suino Nero dei Nebrodi possano, in relazione al loro differente livello di esposizione ai fattori di rischio, influenzare la trasmissione del *Mycobacterium bovis* dal bovino al suino.
Al fine di stimare il rischio per capi e per tipologia aziendale si è proceduto al calcolo della Odds Ratio utilizzando la tabella di contingenza 2x2, mentre l'applicazione del Fisher exact test ha permesso la verifica della significatività delle OR ottenute. Dai risultati ottenuti gli autori ritengono che l'evoluzione delle tipologie di allevamento attualmente presenti sui Nebrodi, verso il sistema di allevamento "en plein-air", potrebbe in futuro ridurre in maniera significativa l'esposizione del suino Nero dei Nebrodi al contagio da *Mycobacterium bovis.*

Abstract. The authors describe a study of different breeding of Nebrodi's black pig may, in relation to their different level of exposure to risk factors, influence the transmission of *Mycobacterium bovis* from cattle to pigs. In order to estimate the risk for animals and different farming it was decided to calculate the Odds Ratio using the 2x2 contingency table, while the application of the Fisher exact test was the verification of the significance of the OR obtained. Results obtained by the authors believe that the evolution of the different farming currently on Nebrodi towards the farming "en plein-air", could in future significantly reduce the exposure of Nebrodi's black pig to infection by *Mycobacterium bovis.*

INTRODUZIONE

Nonostante in Italia i piani di eradicazione siano attivi da decenni l'eradicazione della tubercolosi, in diverse regioni, è lungi dall'essere raggiunta. In provincia di Messina ed in particolare nel territorio dei Nebrodi, si osserva ancora una elevata prevalenza della tubercolosi nel bovino e nel suino Nero dei Nebrodi. L'utilizzo del suino Nero dei Nebrodi nella produzione di prodotti alimentari di

largo consumo presso le popolazioni autoctone, può rappresentare una potenziale fonte d'infezione anche per l'uomo (Surujballi et al., 2002; Parra et al., 2003; Di Marco et al., 2004; Di Marco et al., 2005).
Nell'area Nebroidea, ad esclusione del suino Nero dei Nebrodi selvatico allo stato puro, che rappresenta comunque una grossa realtà, esistono tre differenti tipologie di allevamento: 1) l'allevamento " en plein-air " che riproduce lo stato naturale del suino Nero dei Nebrodi allo stato selvatico; 2) l'allevamento allo stato brado in territori boschivi nel quale il suino Nero dei Nebrodi condivide i pascoli insieme a bovini,ovini e caprini; 3) l'allevamento allo stato semibrado ed in strutture fatiscenti o poco razionali caratterizzato dalla condivisione dei pascoli con bovini, ovini e caprini.
Scopo di questo studio è quello di stabilire quale tipologia di allevamento, condizionando il livello di esposizione alla malattia, è in grado di favorire il rischio di trasmissione della tubercolosi dal bovino al suino Nero dei Nebrodi. Per raggiungere tale obiettivo sono stati dapprima identificati i possibili fattori di rischio quindi, è stato effettuato uno "studio retrospettivo caso-controllo" per stimare il rischio di trasmissione della tubercolosi negli animali e nelle aziende in funzione dell' esposizione o meno ai diversi fattori di rischio (Parodi e Bottarelli, 2004; Mannelli e Tolari,1997).

MATERIALI E METODI

Studio retrospettivo (Caso-Controllo)
L'indagine è stata effettuata al macello su 1130 carcasse di suino Nero dei Nebrodi provenienti da 39 allevamenti. Sulle stesse veniva effettuato un mirato ed accurato esame anatomo-patologico al fine di individuare lesioni macroscopiche ascrivibili a tubercolosi.
Ai fini del presente studio caso-controllo sono stati considerati quali "casi" i soggetti con presenza di linfoadenite granulomatosa ascrivibile a tubercolosi e "controlli" i soggetti con assenza di lesioni.
Si è quindi proceduto ad identificare i fattori di rischio e il livello di esposizione agli stessi per tipologia aziendale: Odds Ratio

Identificazione fattori di rischio e livello di esposizione aziendale
Fattori di rischio:
-ingestione di carcasse o scarti della macellazione di animali infetti;
-somministrazione di derivati della lavorazione del latte;
-contatto con feci bovine per grufolamento;
-acqua di abbeverata in comune.
Livello di esposizione per tipologia aziendale:
- Allevamento "en plein air" (non esposizione ai fattori di rischio)
- Allevamento brado in pascoli boschivi – permanenti (esposizione ai fattori di rischio)
- Allevamento semibrado in strutture "non razionali" (esposizione ai fattori di rischio)

Delle 39 aziende esaminate, 33 sono state considerate esposte(929 capi) e 6 non esposte (201 capi).

Stima del rischio(Odds Ratio) per capi

Per la quantificazione del rischio per i diversi capi ci si è avvalsi della tabella di contingenza 2x2 (Tab. 1), per approntare la quale si sono utilizzati i seguenti dati:

1130 capi analizzati: 45 (casi) sono risultati positivi e 1085 (controlli) negativi
-numero di suini esaminati con presenza di lesioni tubercolari (casi): 45
-numero di suini esaminati con assenza di lesioni tubercolari (controlli):1085
-numero di animali positivi provenienti da allevamenti esposti (43) e da allevamenti non esposti (2)
-numero di animali negativi provenienti da allevamenti esposti (886) e da allevamenti non esposti (199).

Stima del rischio (Odds Ratio) per aziende

Per la quantificazione del rischio per aziende ci si è avvalsi della tabella di contingenza 2x2 (Tab.2), per approntare la quale si sono utilizzati i seguenti dati:

Aziende totali n.39 di cui 11 positive (casi) e 28 negative (controlli)
Aziende esposte n. 33 di cui positive 10 e negative 23
Aziende non esposte n. 6 di cui positive 1 e negative 5

RISULTATI

Calcolo della Odds Ratio (OR) per capi

ODDS RATIO = a/c : b/d = axd/bxc = = 43x199/ 886x2 =8557/ 1772= **4,83**

Una odds ratio di 4,83 denota una associazione positiva tra fattore di rischio ed esposizione allo stesso tra moderata e forte. Per la verifica della significatività applicata alla tabella di contingenza per i capi è stato utilizzato il Fisher exact test: p = 0,01524 (< 0,05);IC al 95% = 1.23-41.47.
Pertanto il valore di OR = 4.83 ha significatività statistica

Calcolo della Odds Ratio per aziende

ODDS RATIO = a/c : b/d = axd/bxc = 50/23= **2,17**
Una odds ratio di 2,17 denota una associazione positiva tra fattore di rischio ed esposizione allo stesso poco più che modesta .
Per la verifica della significatività applicata alla tabella di contingenza per aziende è stato utilizzato il Fisher exact test in cui: p= 0.6548(>0,05); IC 95% = 0.198-112.88.
Pertanto il valore di OR = 2.17 risulta non significativo

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si osserva una significativita'statistica del valore di OR = 4,83 per i capi. Ciò dimostra che all'aumentare dei fattori di rischio per i capi esposti, si osserverà parimenti un innalzamento del valore della OR, viceversa ad una riduzione degli stessi l'OR tenderà a diminuire.
Valutando invece il risultato ottenuto applicando il Fisher exact test alla tabella di contingenza per le aziende si è visto che l'OR = 2,17, pur essendo maggiore di 1, e quindi pur prospettando una tendenza all'associazione positiva tra esposizione ai fattori di rischio e tubercolosi, non è significativa a causa della bassa numerosità campionaria.
In conclusione gli autori ritengono quindi che l'implementazione, attraverso un modesto investimento aziendale, del sistema di all'allevamento "en plein-air" accompagnato da un migliore management potrebbe in futuro ridurre in maniera drastica l'esposizione del suino Nero dei Nebrodi alla tubercolosi .

Tabella 1

	Presenza di lesioni tubercolari	Assenza di lesioni tubercolari	
Suini esposti a TBC bovina	43	886	929
Suini non esposti a TBC bovina	2	199	201
	45 CASI	1085 CONTROLLI	Totale animali 1130

Tabella 2

	Presenza di lesioni tubercolari	Assenza di lesioni tubercolari	
Aziende esposte a infezione tubercolare	10	23	33
Aziende non esposte a infezione tubercolare	1	5	6
	11 CASI	28 CONTROLLI	Totale aziende 39

Bibliografia

1. Di Marco V., Capucchio M.T., Iozzia G., Tomaselli A., Polino S., Vazzana I., Calabrò A., Catalano D., Guarda F. (2004) Tubercolosi nel suino nero dei Nebrodi" in "XXX Meeting SIPAS, Salsomaggiore Terme (PR) 25-26 marzo, pp. 391-397.
2. Di Marco V., Capucchio M.T., Russo M., Tomaselli A., Calabrò A., Leopardi E., Spartà G., Reale S. (2005) Ruolo del Suino Nero dei Nebrodi nella diffusione e persistenza della tubercolosi all'interno di un'Area protetta in "XXXI Meeting SIPAS, Mantova 17-18 marzo 2005, pp. pp.337-343 .
3. McInerney J., Small K.J., Caley P. (1995) Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Norther Territory. Aust. Vet. J., 72:448-451.
4. Mannelli A., Tolari F. (1997) Rischio in epidemiologia veterinaria - Atti della Società Italiana di Buiatria, Bergamo 30 maggio-1 giugno; pp. 163-174
5. Parodi S., Bottarelli E. (2004) Introduzione allo studio caso-controllo in epidemiologia- Ann. Fac. Medic.Vet. di Parma , vol.XXIV, , pp.209-236.
6. Corner L.A.L. (2006) The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. – Vet. Microbiol. 112 : 303-312
7. Parra A., Fernandez-Llario P., Tato A., Larrasa J., Garcia A., Alonso J.M., .Hermoso de Mendoza M., Hermoso de Mendoza J. (2003) Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. Vet. Microbiol., 97:123-133.

FORT DODGE

FORT DODGE

FORT DODGE

Fort Dodge Animal Health S.p.A. | Via G. Amendola, 8 | I-40121 Bologna
info-it@fdah.com | www.fortdodge.it

SU UN CASO DI PORPORA TROMBOCITOPENICA ISOIMMUNE IN SUINETTI NEONATI

ISOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA IN NEONATAL PIGLETS: A CASE REPORT

GALLETTI E.[1], MERIALDI G. [1], ANTONELLI A.[2], BRINI E.[3], FUSARO L.[4], SARLI G. [4], FONTANA M.C. 1, MARTELLI P[5].

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"-Sezione di Bologna;
[2] Veterinario Libero Professionista;
[3] Dipartimento Clinico Veterinario, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna;
[4]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna;
[5]Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.

Parole chiave: emorragie, neonati, malattia da isoimmunizzazione, porpora tromboci topenica, anemia

Key words: haemorrhages, isoimmune diseases, thrombocytopenic purpura, anemia

Riassunto. Gli Autori descrivono un caso clinico di sindrome emorragica caratterizzata da petecchie, ecchimosi, emorragie multiple e mortalità che ha coinvolto i suinetti neonati di un allevamento a ciclo chiuso.
I casi si sono verificati nel periodo da maggio 2008 a gennaio 2009 ed hanno interessato 28 nidiate. Su un totale di 322 suinetti nati vivi, 55 hanno manifestato sintomatologia e 25 sono deceduti per l'evoluzione della sindrome emorragica. L'esame clinico degli animali è stato affiancato da accertamenti diagnostici quali l'esame emocromocitometrico su alcuni soggetti colpiti dalla sindrome emorragica, esami anatomapatologici, istopatologici, microbiologici ed accertamenti tossicologici sui soggetti deceduti.. Gli accertamenti di laboratorio hanno evidenziato una grave trombocitopenia con aumento dei reticolociti circolanti.
Sulla base dei rilievi anamnestici, clinici e delle indagini di laboratorio è stata formulata una diagnosi di porpora trombocitopenica isoimmune. Vengono discussi gli elementi diagnostico- differenziali.

Abstract. The Authors describe a case report of an haemorrhagic syndrome characterised by multiple haemorrhages, spontaneous pethechiae and ecchymoses that occurred in a farrow to finish pig herd. The clinical signs appeared between May 2008 to January 2009 and occurred in 28 litters. Upon a total of 322 piglets, fifty-five showed haemorrhagic symptoms and 25 died. Gross pathology, histopathology, microbiological and toxicological exams were carried out in order to identify the ethiology of the disorder. Haematological parameters of six affected piglets were determined. The affected animals showed severe thrombocytopenia and an increased number of retics cells. The results of the laboratory investigations were suggestive of isoimmune thrombocytopenic purpura and allowed to exclude an haemolytic disease.

INTRODUZIONE

La riduzione del numero di piastrine è tra le cause più comuni di emorragia negli animali. La trombocitopenia è una patologia complessa che può riflettere quadri di diminuita produzione, distruzione accelerata, sequestro anomalo o eccessiva perdita extracorporea di piastrine per cause traumatiche, infettive, neoplastiche, tossiche o immunitarie (Catalafamo e Dodds, 1988).
La porpora trombocitopenica neonatale isoimmune dei suinetti è stata descritta per la prima volta in Norvegia nel 1963 da Stormorken et al.,; successivamente, vengono segnalati episodi sporadici (Nordstoga, 1965; Lie, 1968; Saunders e Kinch, 1968; Dimmock et al., 1982; Forster, 2007). Tale entità presenta un'incidenza molto bassa, inferiore all'1%, e si manifesta con maggior frequenza nei suini Large White e Landrace, di norma, in soggetti nati da scrofe al secondo parto e oltre. I connotati clinici sono parzialmente condivisi dalla malattia emolitica neonatale che si manifesta nei primi giorni di vita con anemia e ittero (Taylor, 2006). Alcuni Autori hanno riportato casi di malattia emolitica neonatale associati a porpora trombocitopenia isoimmune (Linklater et al., 1973; Hall et al., 1972). L'eziologia delle due malattie riconosce una eziologia su base immunitaria con produzione di anticorpi verso gli antigeni piastrinici fetali o verso i globuli rossi. Gli anticorpi rivolti verso le cellule del sangue dei suinetti si sviluppano nella scrofa durante la gestazione; lo sviluppo di anticorpi è causato dalle caratteristiche antigeniche del verro utilizzato per la fecondazione che differiscono da quelle della scrofa.
Dal punto di vista clinico la porpora trombocitopenica è caratterizzata da emorragie multiple che si verificano allorquando il numero dei trombociti periferici scende al di sotto di 30.000-50.000/µl e evolve solitamente in maniera infausta per tutta o parte della nidiata in 14-30 giorni. Nella malattia emolitica neonatale il quadro clinico anemico si associa costantemente ad ittero, con evoluzione più rapida (morte a 2-3 giorni) (Taylor, 2006). La sintomatologia, da sola, è suggestiva della diagnosi anche se è necessario intraprendere un percorso diagnostico differenziale basato su accertamenti laboratoristici sul sangue (esami ematologici) nonché indagini *post-mortem*. , Nell'ambito di una diagnosi differenziale si impone la formulazione di sospetto diagnostico verso alcune infezioni setticemiche (*Escherichia coli, Clostridium spp., Streptococchi*) malattie virali (Peste suina classica) e avvelenamento da anticoagulanti.
Questa nota descrive un caso clinico di porpora emorragica neonatale ed i risultati degli accertamenti diagnostici che hanno permesso di formulare una diagnosi di porpora trombocitopenica isoimmnune.

CASO CLINICO

Gli animali oggetto dello studio sono pervenuti da un allevamento a ciclo chiuso in cui si sono manifestati episodi di porpora emorragica nei suinetti lattanti nel periodo Maggio 2008 - Gennaio 2009. La sintomatologia è stata registrata su 28 figliate di 27 diverse scrofe, di cui solo due erano al primo parto. Le scrofe sono state fecondate utilizzando seme di verri aziendali. La pratica di inseminazione avveniva

per tre giorni consecutivi utilizzando, sulla stessa scrofa, dosi di seme ottenute anche da verri diversi. Tre nuovi verri sono entrati in produzione circa tre mesi prima della comparsa dei segni clinici.
I suinetti nati vivi sono stati 322 con una media di 11.5 suini per nidiata; cinquantacinque suinetti, hanno evidenziato dai primi giorni di vita quadri emorragici di diversa gravità. Il quadro clinico si caratterizzava per petecchie, ecchimosi ed emorragie sottocutanee diffuse; all'interno delle nidiate il numero medio di soggetti colpiti è stato pari a 1.96 ± 1.97. In una nidiata, in particolare, sono stati colpiti 11 suini su 12. Venticinque di questi suinetti sono venuti a morte all'età di 3-4 giorni. All'interno delle nidiate il numero massimo di suini deceduti è stata di sei soggetti mentre in alcune nidiate colpite la mortalità è stata nulla.

ACCERTAMENTI DIAGNOSTICI DI LABORATORIO

Sei suinetti, pervenuti presso la Sezione di Bologna dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, sono stati sottoposti all'esame anatomopatologico. Da 3 soggetti di 4 giorni sono anche stati campionati rene, fegato, polmone, milza, cuore e midollo osseo per l'esame isologico (fissazione in formalina, inclusione in paraffina e colorazione con ematossilina-eosina di sezioni di 4 micronm). Su campioni di fegato, rene e milza è stato eseguito l'esame batteriologico mediante semina su Agar sangue e su Gassner agar.
Sugli organi in pool è stato condotto l'esame virologico mediante inoculazione su coltura cellulare ed è stata eseguita la ricerca del virus della PRRS tramite tecnica PCR. Data la presenza di lesioni emorragiche è stata inoltre effettuata la ricerca di cumarinici (Bromadiolone, Coumaclor, Coumafuryl, Coumatetralyl e Warfarin) tramite tecnica HPLC per verificare il possibile avvelenamento da tali sostanze.
Inoltre, da sei soggetti con lesioni di tipo emorragico e da tre soggetti clinicamente sani della stessa sala parto e della stessa età, è stato eseguito un prelievo si sangue venoso sottoposto ad esame emocromocitometrico completo presso il laboratorio centralizzato (SEPAC VET) del Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna. L'esame di cui trattasi è stato effettuato tramite analizzatore Cell-Dyn 3500R (Abbott) e integrato da osservazione al microscopio ottico degli strisci di sangue previa colorazione May-Grumwald Giemsa e specifica al Blu cresile brillante per la conta reticolocitaria.

RISULTATI

L'esame anatomopatologico ha evidenziato in tutti i soggetti esaminati lesioni emorragiche diffuse alla cute, al sottocute e alle sierose. Le emorragie cutanee si presentavano come petecchie, soffusioni e spandimenti localizzati principalmente carico delle regioni della testa, dell'addome, dell'inguine e della faccia plantare del piede (Figura n. 1). Emorragie puntiformi sono state rilevate a carico del rene mentre i linfonodi si presentavano marcatamente emorragici. Inoltre, assai prevalente è apparsa

Figura 1: Emorragie cutanee alla regione addominale (A) e soffusioni emorragiche alla faccia plantare del piede (B).

Figure 1: Abdominal skin (A) and foot sole haemorrhages

una infiltrazione emorragica del mesocolon e dell'epicardio. Nei soggetti sottoposti a prelievo ematico è stata procurata una imponente emorragia sottocutanea nell'area della puntura venosa di prelievo. L'esame istologico (fig.2) ha confermato la presenza di emorragie interstiziali nel cuore (sia a livello intramurale che, molto evidenti, a livello sub-endocardico (fig. 3a)), nei reni (sia a localizzazione sottocapsulare che corticale profonda e nel bacinetto (fig. 3b), nel polmone e nel fegato. In quest'ultimo erano presenti numerose aree di emopoiesi extramidollare con una apprezzabile presenza di megacariociti (fig.3c), ben evidenti anche nel midollo osseo (fig. 3d). Nei polmoni era costantemente presente una polmonite interstiziale moderata multifocale.
Gli accertamenti microbiologici hanno dato esisto costantemente negativo, parimenti a quelli tossicologici.
I risultati dell'esame emocromocitometrico sono riportati nelle tabelle 1 e 2. I valori di emoglobina, ematocrito ed eritrociti dei soggetti malati risultavano inferiori del 50% rispetto a queli dei soggetti sani utilizzati come controllo. La media della conta piastrinica, in assenza di aggregati piastrinici, ha messo in evidenza una netta riduzione dei trombociti che risultano inferiori di 7 volte rispetto alla media dei soggetti sani. Nei soggetti colpiti dalla fenomenologia emorragica la media della percentuale dei reticolociti è risultata nettamente superiore (12.2%) rispetto a quella dei soggetti soggetti clinicamente sani (2.35%). Il volume corpuscolare medio (MCV) così come il valore della ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW) sono risultati superiori negli animali malati, mentre l'emoglobina corpuscolare media (MCH) e la concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media (MCHC) è risultata equiparabile tra i due gruppi. Inoltre, il rapporto tra le cellule nucleate del sangue (NRBC/100 WBC) è risultato più elevato nei soggetti malati rispetto ai sani. Relativamente alla morfologia eritrocitaria, nei soggetti malati, è stata evidenziata una marcata anisocitosi, policromasia e presenza di leptociti (essenzialmente cellule bersaglio).

Soggetti malati	1	2	3	4	5	6	Media
Emoglobina gr %	3.3	7	4.8	7.7	5.1	5.4	5.5
Ematocrito %	10.2	19.8	14.3	25.9	17	17.7	17.5
Eritrociti /mm3	1420000	2640000	2000000	3990000	2600000	250000	2525000
Piastrine /mm3	7400	104000	32700	38100	10800	8340	33557
Leucociti /mm3	10100	7700	7900	4100	2300	5000	6750
MCV fL	72	75.1	71.3	64.9	65.5	70.7	69.9
MCHC gr %	32.3	35.6	34.2	29.8	30.5	30.8	32.2
MCH pgr	23.2	26.8	24.4	19.3	20	21.8	22.6
RDW %	21.8	25.1	22.4	21.3	20.2	21.7	22.1
NRBC/100 WBC	3	16	27	17	3	-	13.2
Reticolociti %	18.1	14.5	17.8	1.31	7.8	14	12.2
Linfociti /mm3	2626	2772	3950	1722	828	2250	2358
Neutrofili /mm3	7373	4620	1501	1640	989	2150	3225
Eosinofili /mm3	101	77	79	205	69	150	113.5

Tab. 1: Esame emocromocitometrico dei soggetti malati
Tab.1: Haematological parameters of affected animals

Soggetti sani	7	8	9	Media
Emoglobina gr %	8.6	10.2	9.1	9.3
Ematocrito %	26.4	30.8	27.4	28.2
Eritrociti /mm3	4050000	4900000	4220000	4390000
Piastrine /mm3	92400	359000	272000	241133
Leucociti /mm3	5200	4600	4700	4833.3
MCV fL	65.1	62.8	65.1	64.3
MCHC gr %	32.9	33.2	33.2	33.1
MCH pgr	21.4	20.9	21.6	21.3
RDW %	19.2	18.4	19.9	19.2
NRBC/100 WBC	1	2	2	1.7
Reticolociti %	3.1	assenti	1.6	2.35
Linfociti /mm3	1456	2070	1551	1692
Neutrofili /mm3	3484	2346	2773	2867
Eosinofili /mm3	52	assenti	188	120

Tab. 2: Esame emocromocitometrico dei soggetti sani
Tab.2: Haematological parameters of healthy animals

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei dati anamnestici, clinici, dell'esame emocromocitometrico, delle osservazioni anatomo- istopatologiche, microbiologiche e tossicologiche effettuate sono state formulate ipotesi diagnostiche che sono state inserite in un percorso diagnostico differenziale volto a definire una diagnosi eziologica della sindrome emorragica osservata.
L'esito negativo degli esami batteriologici e virologici e della ricerca di anticoagulanti cumarinici ha escluso la possibili cause di natura infettive e tossica.
L'approfondimento del caso attraverso gli esami emocromocitometrici condotti su soggetti con sintomatologia e su soggetti apparentemente sani ha portato un contributo determinante ai fini diagnostici. La conta piastrinica sui soggetti malati ha evidenziato una marcata riduzione dei trombociti, in assenza di aggregati piastrinici, e un decremento dei valori di emoglobina, ematocrito ed eritrociti. Nei soggetti con sintomatologia, inoltre, la percentuale media dei reticolociti è risultata superiore al 12% rispetto alla media del 2.35% dei soggetti sani, sostenendo l'evidenza di un quadro di anemia rigenerativa in assenza di alterazioni eritrocitarie riconducibili a fenomeni emolitici. Tale dato è stato supportato dalla presenza nei soggetti malati di un valore alto di MCV, indice macrocitosi, e dal valore di RDW, o indice di anisocitosi, che permette di sospettare la presenza di eritrociti di dimensioni diverse tra loro, dato avvalorato peraltro dalla valutazione morfologica al microscopio ottico. Inoltre il rapporto tra le cellule nucleate del sangue (NRBC) è a favore delle degli eritroblasti. che rappresentano cellule rosse immature.
L'esclusione di malattie infettive, i dati di laboratorio (piatrinopenia marcata) e la coincidenza temporale dell'entrata in produzione di nuovi verri emersa dall'indagine anamnestica hanno quindi indirizzato il percorso diagnostico verso una patologia su base immunitaria. I danni alle piastrine ad eziologia immunitaria e il successivo decremento di tali cellule nel torrente circolatorio sono infatti tra le cause più frequenti di trombocitopenia negli animali (Catalafamo e Dodds, 1988).

La trombocitopenia isoimmune neonatale del suinetto origina dalla produzione di anticorpi materni verso gli antigeni della superficie delle piastrine fetali; gli anticorpi materni si legano agli antigeni delle piastrine dei neonati determinandone la prematura distruzione. La dimostrazione da parte di Andersen e Nielsen (1973) di agglutinine nel siero di scrofe madri di soggetti ammalati è stato il primo dato che ha supportato l'ipotesi dell'isoimmunizzazione come eziologia della porpora trombocitopenica neonatale dei suinetti. Come evidenziato da uno studio di Saunders e Kinch (1968) le agglutinine materne sono assenti nel siero dei suinetti prima dell'assunzione di colostro ma già con la prima poppata le agglutinine compaiono nel siero dei suinetti. Gli anticorpi che si legano alle piastrine durante questo periodo sono quindi responsabili sia del rapido decremento di tali cellule e pertanto delle diffuse emorragie che compaiono precocemente nei primi giorni di vita, sia della soppressione dei megacariociti che determina a un quadro di trombocitopenia più tardiva a manifesto a circa 2-3 settimane di età. La presenza di numerosi megacariociti, nelle aree di ematopoiesi sia midollare che epatica nei casi esaminati istologicamente nel corso del presente caso clinico, riflette la condizione iniziale della malattia (4 giorni), non essendosi raggiunto il tempo necessario per registrare anche la riduzione numerica dei megacariociti.
La marcata trombocitopenia in assenza di quadri diretti ed indiretti di eritrolisi hanno permesso di escludere una forma di anemia emolitica avvalorando la diagnosi di por-

pora trombocitopenica isoimmune. In base a tale diagnosi, a partire da Gennaio 2009, nell'allevamento in causa è stata modificata la pratica di inseminazione assicurando che ciascuna scrofa sia fecondata da un solo verro. Con le nuove nascite sarà quindi possibile raccogliere ulteriori dati e pervenire all'individuazione del verro ipoteticamente coinvolto nel processo patogenetico che sostiene la malattia isoimmunitaria diagnosticata e riportata nella presente segnalazione

Bibliografia:

Catalafamo J.L., Dodds J.D. (1988) "Hereditary and acquired thrombopathias". Vet Clin North Am: Small Animal Practice. 18. (1). 185-193.

Stormorken H., Svenkerud R., Slagsvold P., Lie H.. Lundevall J. (1963) "Thrombocytopenic bleedings in young piglets due to maternal isoimmunization". Nature. 198. 1116-1117.

Nordstoga K. (1965) "Thrombocytopenic purpura in baby pigs caused by maternal isoimmunization". Path. Vet. 2. 601-610.

Lie H. (1968) "Thrombocytopenic purpura in baby pigs". Acta vet. scand. 9. 285-301.

Saunders C.N.,Kinch D.A. (1968) "Thrombocytopenic purpura of pigs". J. Comp. Path. 78. 513-525.

Dimmock C.K., Webster W.R., Shiels I.A., Edwards C.L. (1982). " Isoimmune Thrombocytopenic purpura in piglets". Aust Vet J. 59. 157-159.

Forster L. (2007) "Neonatal alloimmnune Thrombocytopenia. purpura and anemia in 6 neonatal piglets". CJV. 48. 855-857.

Taylor D.J. (2006) "Pig diseases" 8a ed.. Cambridge. Burlington Press.

Ebbe S., Phalen E., Overcash J., Howard D., Stohlman Jr. (1971) "Stem cell response to thrombocytopenia. J. lab. & Clin. Med. 78. 872-881.

Andersen S., Nielsen R. (1973) "Pathology of purpura thrombocytopenia in piglets". Nord Vet Med. 25. 210-219.

Linklater K.A., McTaggart H.S., Imlah P. (1973) "Haemolytic disease of the newborn. thrombocytopenic purpura and neutropenia occurring concurrently in a litter of piglets. Br. Vet. J. 129. 36-46.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DI ALCUNI PARAMETRI BIOCHIMICI IN SCROFE

REFERENCE VALUES OF HAEMATOLOGICAL PARAMETERS IN SOWS

S. ROTA NODARI, I. ARCHETTI, O. GUERRA, P. CANDOTTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia
email: sara.rotanodari@bs.izs.it

Parole chiave: scrofa, intervallo di riferimento, ematochimica

Key words: sow, reference interval, haematochemistry

Riassunto. In tre allevamenti commerciali del Nord Italia, sono stati selezionati 41 scrofe ibride in gestazione che erano risultati sani ad un esame clinico. Da tutti gli animali sono stati eseguiti dei campioni ematici che sono stati analizzati per diversi parametri biochimico clinici (Proteine totali, Albumina plasmatica, Globuline plasmatiche, Glucosio, Colesterolo, Trigliceridi, β-idrossibutirato, Alanino aminotransferasi, Aspartato aminotransferasi, Fosfatasi alcalina, Gamma-glutamiltransferasi, Amilasi, Urea, Creatinina, Creatinchinasi, Lattico deidrogenasi, Bilirubina totale, Calcio, Fosforo, Magnesio, Sodio, Potassio, Cloro, Rame, Ferro, Zinco). I dati raccolti sono stati elaborati per ricavare gli intervalli percentili di riferimento. Un preliminare confronto con quelli pubblicati in letteratura ha mostrato differenze che sottolineano l'importanza che ogni laboratorio stabilisca valori e intervalli di riferimento da utilizzare a fini diagnostici e di ricerca in funzione delle caratteristiche del patrimonio zootecnico di interesse.

Abstract. 41 healthy breeders were selected in commercial farms of Northern Italy. Blood samples were collected from animals and tested for several parameters (Total proteins, Albumine, Globulin, Glucose, Cholesterol, Triglycerides, β-hydroxybutyrate, Total bilirubin, Alanine aminotransferase, Aspartate aminotransferase, Alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, Amylase, Urea, Creatinine, Creatine kinase, Lactate dehydrogenase, Calcium, Phosphorus, Magnesium, Sodium, Potassium, Chlorine, Copper, Iron, Zinc). Collected data were used to calculate percentile reference intervals for the selected haematochemical parameters. The differences found in comparing our results with published data suggested that each laboratory should establish reference values and intervals for diagnostic and research purposes.

INTRODUZIONE

La misurazione dei parametri biochimici del sangue può fornire informazioni importanti sulla salute e sul metabolismo degli animali (Friendship R.M. and Henry S.C., 1992) ed è uno strumento diagnostico pratico per valutarne le condizioni patologiche o per monitorare lo stato sanitario di gruppo (Verheyen A.J.M. et al., 2007). La biochimica

è utilizzata maggiormente nella diagnosi clinica in bovini e pecore, mentre per valutare la produttività degli allevamenti suinicoli vengono utilizzati tradizionalmente indicatori quali le *performance* riproduttive, l'incremento ponderale giornaliero, l'indice di conversione alimentare e la mortalità. Tuttavia, la misurazione del livello di determinati metaboliti può fornire interessanti informazioni aggiuntive sul profilo sanitario e metabolico di gruppi di suini (Morris R.S., 1998), purché si abbiano a disposizione valori di riferimento specifici per la categoria di interesse.
L'obiettivo del presente lavoro era quello di determinare valori di riferimento per i parametri biochimici nella categoria delle scrofe in gestazione.

MATERIALI E METODI

In 3 allevamenti commerciali del Nord Italia sono state selezionate 41 scrofe che erano in buono stato di nutrizione e clinicamente sane. Tutti gli animali erano a circa 60 giorni di gestazione.
Dopo aver sottoposto a contenimento gli animali, sono stati collezionati campioni ematici dalla vena giugulare in provette contenenti anticoagulante LH (Vacutainer®, Becton, Dickinson) e sono stati mantenuti alla temperatura di 4°C fino all'arrivo in laboratorio. Il plasma è stato poi separato mediante centrifugazione (3000 rpm per 15 minuti) e congelato (-20°C). Tutti i campioni sono stati eseguiti al mattino e processati il giorno stesso.
Le analisi sono state eseguite mediante analizzatore automatico Synchron CX® della ditta Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).
Per ogni campione sono state prese in esame ventisette variabili ematochimiche: proteine totali, albumina, globuline, rapporto albumina/globuline, glucosio, colesterolo, trigliceridi, β-idrossibutirato, bilirubina totale, alanino amino transferasi (ALT), aspartato amino transferasi (AST), fosfatasi alcalina (ALP), gamma-glutamiltransferasi (γ-gt), amilasi, urea, creatinina, creatinchinasi (CK), lattico deidrogenasi (LDH), calcio, fosforo, magnesio, sodio, potassio, cloro, rame, ferro, zinco.

Analisi statistica

Per il calcolo degli intervalli di riferimento è stato applicato un metodo non parametrico, individuando per ciascun parametro il 2.5° e il 97.5° percentile della distribuzione dei valori osservati.
I dati sono presentati come 2.5° (P.025), 50° (mediana) e 97.5° (P.975) percentile. I limiti inferiore e superiore dell'intervallo così definito includono il 95% dei valori osservati per ciascun parametro.
L'analisi dei dati è stata realizzata utilizzando il software statistico R versione 2.8.0 rilasciata il 20 ottobre 2008 (r).

RISULTATI

I risultati degli esami condotti sui campioni ematici sono riportati in tabella 1.
Nonostante l'accuratezza con cui è stato effettuato il prelievo, alcuni campioni di plasma hanno presentato un evidente stato di emolisi e sono poi stati esclusi dall'elaborazione statistica.

Tabella 1. Intervalli di riferimento dei parametri biochimici in scrofe

Parametri	Unità di misura	n	P.025	mediana	P.975
Proteine totali	g/L	38	58.9	74.0	83.1
Albumina	g/L	38	31.3	39.1	45.4
Globuline	g/L	38	25.6	33.9	42.4
A/G		39	0.9	1.2	1.5
Glucosio	mmol/L	37	3.1	4.85	5.55
Colesterolo	mmol/L	41	1.37	2.36	2.89
Trigliceridi	mmol/L	29	0.3	0.45	0.89
β-idrossibutirato	mmol/L	30	0.04	0.13	0.29
Bilirubina totale	µmol/L	29	2.73	4.24	6.41
ALT	UI/L	36	28.6	45.5	67.8
AST	UI/L	35	31.3	47	83.1
ALP	UI/L	36	50.8	107	166
γ-GT	UI/L	38	22.9	39.5	58.1
Amilasi	UI/L	36	768	1038	1562
Urea	mmol/L	41	2.92	4.28	6.24
Creatinina	µmol/L	25	102	157	202
CK	UI/L	26	390	967	4270
LDH	UI/L	41	715	1313	2439
Calcio	mmol/L	40	2.16	2.39	2.63
Fosforo	mmol/L	39	1.98	2.70	3.63
Magnesio	mmol/L	40	0.71	0.83	1.08
Sodio	mmol/L	38	136	141	144
Potassio	mmol/L	36	4.16	4.65	5.77
Cloro	mmol/L	30	101	105	109
Rame	mmol/L	34	36.5	43.1	57.1
Ferro	mmol/L	30	8.56	19.2	26.7
Zinco	mmol/L	27	5.02	7.4	10.8

n= n° di campioni utilizzati per il calcolo dei percentili
$P._{025}$ e $P._{975}$= percentile 2.5° e 97.5° della distribuzione

DISCUSSIONE

La presente prova ha confermato come la fase vera e propria di prelievo del sangue rappresenti un punto critico per l'idoneità del campione ematico. Nonostante, infatti, i prelievi siano stati eseguiti in questa prova dal medesimo operatore con esperienza specifica, molti campioni sono comunque risultati emolitici e quindi non analizzabili per alcuni parametri.
Numerosi fattori possono influenzare i valori dei parametri ematochimici dei suini. Oltre alla variabilità individuale occorre considerare fattori quali sesso (Wilson G.D. et al., 1972), età (Wilson G.D. et al., 1972; Friendship R.M. et al., 1984; Reese D.E. et al., 1984; Tumbleson M.E. et al., 1986; Groth Von W. et al., 1986; Heath M.F., 1991; Dubreuil P. and Lapierre H., 1997; Egeli A.K.et al., 1998; Prasad P.E. and Dilip Kumar G., 2002), razza (Wilson G.D. et al., 1972; Groth Von W. et al., 1986), gravidanza e lattazione (Tewes H. et al., 1979; Reese D.E. et al., 1984; Verheyen A.J.M. et al., 2007), alimentazione (Wilson G.D. et al., 1972), stress (Dubreuil P. et al., 1990). Anche l'esperienza dell'operatore che esegue il pre-

lievo (tempo impiegato, contenimento) può influenzare i valori ematici osservati così come le procedure di campionamento e le metodiche di analisi (Tumbleson M.E. et al., 1986, Framstad T. et al., 1989; Dubreuil P. et al., 1990). Differenze significative nella valutazione di variabili ematochimiche sono state rilevate in relazione a processi emolitici di vario grado a carico dei campioni esaminati (Dorner J.L. et al., 1983; Tumbleson M.E. et al., 1986; Lippi G. et al., 2006).

L' **albumina** rappresenta la componente maggiore delle proteine plasmatiche, è essenziale per la regolazione e il mantenimento della pressione colloido-osmotica del sangue ed è coinvolta nel trasporto di metaboliti scarsamente solubili. L'albumina è prodotta nel fegato e catalizzata in tutti i tessuti metabolicamente attivi. La sua concentrazione plasmatica può risultare diminuita durante la gravidanza e nei primi giorni di lattazione o in caso di epatopatie, con conseguente diminuzione della protidemia totale (Kaneko J.J. et al., 1997).

Le **globuline**, distinte in α, β e γ-globuline in base alla loro mobilità elettroforetica, svolgono numerose funzioni. Si osserva un lieve aumento della concentrazione ematica di globuline all'inizio della gravidanza e un forte aumento delle γ-globuline in prossimità del parto, che condiziona un aumento delle proteine totali (Kaneko J.J. et al., 1997). Patologie infettive e processi infiammatori inducono un aumento della globulinemia, stati imunodepressivi la diminuiscono (Kaneko J.J. et al., 1997).

Il **glucosio** è il principale nutriente cellulare e tissutale, la cui concentrazione ematica può essere influenzata da numerosi fattori fisiologici o patologici. La valutazione di questo parametro risulta significativa in numerose condizioni, in particolare in caso di carenze alimentari e di disordini endocrini dato che la glicemia è il risultato di un meccanismo bilanciato di interazione ormonale che condiziona la sua introduzione e rimozione dal circolo ematico (Kaneko J.J. et al., 1997).

Il **colesterolo** è veicolato nel sangue sotto forma di lipoproteine il cui livello ematico può essere alterato da disturbi endocrini o del metabolismo dei carboidrati (Kaneko J.J. et al., 1997). Faustini M. et al. (2002) ha rilevato in scrofe gravide valori di colesterolemia significativamente superiori a quelli di animali non gravidi. Arantes V. et al. (2004) ha misurato i valori di glicemia e colesterolemia a 0, 35, 70 e 105 giorni di gravidanza, osservandone una diminuzione verso la fine del primo terzo della gestazione. Reese D.E. et al. (1984) ha riscontrato una diminuzione della glicemia e un aumento della colesterolemia nel corso della lattazione.

I **trigliceridi** sono componenti delle lipoproteine plasmatiche che svolgono un ruolo importante nel metabolismo in quanto fonti di energia e la cui sintesi nei tessuti adiposi è regolata da meccanismi ormonali oltre che dalla disponibilità di substrati (Kaneko J.J. et al., 1997). La concentrazione dei trigliceridi nelle scrofe è più alta durante la gravidanza che durante la lattazione (Reese D.E. et al., 1984).

Sia il colesterolo che i trigliceridi possono diminuire in relazione a patologie epatiche (Kaneko J.J. et al., 1997).

Il β-**idrossibutirato** è un elemento importante nel metabolismo animale. Valori aumentati rivestono importanza clinica poiché vengono considerati indicativi di patologia da carenza energetica (Kaneko J.J. et al., 1997).

La **bilirubina** è un prodotto del catabolismo dell'emoglobina e, in misura minore, della mioglobina che viene legata all'albumina per essere trasportata nel plasma fino a raggiungere il fegato ed essere quindi escreta nella bile. L'aumentata bilirubinemia conferisce a cute e mucose la colorazione giallastra definita ittero. Questa condizione clinica può essere provocata da emolisi o da insufficienza epatobiliare (Kaneko J.J. et al., 1997). Una diminuzione

significativa si può rilevare all'inizio della gravidanza (Kaneko J.J. et al., 1997).
L'**alanino aminotransferasi** (ALT) è una transaminasi ampiamente presente in tutti i tessuti dell'organismo, comunemente considerata un indicatore di danno epatico, anche se meno epato-specifica nel suino rispetto ad altre specie (Wilson G.D. et al., 1972; Boyd J.W., 1983; Kaneko J.J. et al., 1997).
L'**aspartato aminotransferasi** (AST) è un enzima considerato praticamente ubiquitario, il cui livello ematico aumenta all'inizio della gravidanza e che si trova in concentrazioni molto elevate nel plasma in seguito a gravi danni tissutali di origine muscolare o epatica (Kaneko J.J. et al., 1997). Dubreuil P. e Lapierre H. (1997) hanno rilevato una diminuzione della concentrazione ematica di ALT e AST nel corso della lattazione.
La **fosfatasi alcalina** (ALP) è presente all'interno degli epatociti e a livello di reni, intestino, tessuto osseo e placenta. Consente l'esplorazione del danno epatocitario e dell'induzione enzimatica (aumentata produzione di enzima) (Kaneko J.J. et al., 1997). La fosfatasi alcalina aumenta durante la gravidanza tornando a valori normali nella settimana precedente il parto (Verheyen A.J.M. et al., 2007), è normale che sia maggiormente presente nei soggetti giovani, essendo indispensabile nella loro spinta mineralizzazione ossea (Framstad T. et al., 1991; Kaneko J.J. et al., 1997; Egeli A.K. et al., 1998), ma può aumentare anche in corso di patologie ossee (Kaneko J.J. et al., 1997).
La **gammaglutamiltransferasi** (γ-GT) si trova in alte concentrazioni nel fegato, soprattutto nei dotti biliari, ma può avere anche origine pancreatica e renale. Valori elevati sono solitamente correlati a patologie epatiche o colestasi (Gresham A.C.J., 1994; Kaneko J.J. et al., 1997). Aumenta significativamente dopo il parto (Dubreuil P. and Lapierre H., 1997; Kaneko J.J. et al., 1997; Verheyen A.J.M. et al., 2007).
L'a**milasi** è un enzima che catalizza l'idrolisi di zuccheri complessi, prodotto principalmente nel pancreas ed eliminato attraverso le vie urinarie. Un aumento del suo livello ematico può essere causato da patologie pancreatiche o da insufficienza renale (Kaneko J.J. et al., 1997).
L'**urea** è il prodotto finale del catabolismo delle proteine che viene prodotto nel fegato ed escreto dal rene. La sua concentrazione plasmatica è espressione di 2 processi: capacità di formazione e capacità di eliminazione. Un suo aumento può pertanto riflettere aumentato catabolismo proteico o diminuita escrezione renale (Gresham A.C.J., 1994; Kaneko J.J. et al., 1997). Verheyen A.J.M. et al. (2007) ha rilevato un aumento della sua concentrazione ematica da tre settimane prima fino a tre settimane dopo il parto.
La **creatinina** è un prodotto del metabolismo della creatina che si forma a livello muscolare e viene eliminato attraverso le urine. La creatininemia viene utilizzata come indicatore della funzionalità renale. L'iperfiltrazione glomerulare provoca ipocreatininemia, l'insufficienza renale provoca ipercreatininemia (Gresham A.C.J., 1994; Kaneko J.J. et al., 1997). La sua concentrazione risulta inoltre più alta durante la gravidanza che durante la lattazione poiché diminuisce dopo il parto (Reese D.E. et al., 1984; Verheyen A.J.M. et al., 2007).
La **creatinchinasi** (CK) è un enzima citoplasmatico che ha accesso al sangue a seguito della modificazione della membrana di un certo numero di cellule muscolari. Valori elevati di CK sono indice di danno muscolare, ma anche iniezioni intramuscolari possono indurre aumenti rilevabili della sua concentrazione ematica (Kaneko J.J. et al., 1997). Nelle scrofe è stato riscontrato in quantità maggiori sia durante la gravidanza che durante la lattazione (Reese D.E. et al., 1984).
La **lattico deidrogenasi** (LDH) è ampiamente distribuita nell'organismo perciò un suo aumento è riscontrabile in numerose patologie tissutali, oltre che fisiologicamente all'inizio della gravidanza (Kaneko J.J. et al., 1997).

I livelli ematici di **Calcio** e **Fosforo** tendono a diminuire durante la gravidanza, come quelli del **Potassio** (Kaneko J.J. et al., 1997). Il **Magnesio**, all'opposto di questi, diminuisce all'inizio della gravidanza per tornare a livelli normali verso la fine (Kaneko J.J. et al., 1997).
Numerosi lavori pubblicati in letteratura riportano i valori e gli intervalli di riferimento calcolati per la maggior parte dei parametri ematochimici di più comune utilizzo nella pratica clinica (Friendship R.M., 1984; Reese D.E. et al., 1984; Groth Von W. et al., 1986; Tumbleson M.E. et al., 1986; Odink J. et al., 1990; Heath M.F. et al., 1991; Elbers A.R.W. et al. 1994; Dubreuil P. et al., 1997; Kaneko J.J. et al., 1997; Egeli A.K.1998; Faustini M. et al., 2000). Da una prima osservazione emergono discrepanze tra questi e quelli determinati in questo lavoro per alcuni dei parametri presi in esame. Rispetto, ad esempio, ai valori di riferimento pubblicati da Kaneko J.J. et al. (1997) per la categoria "pig" i valori da noi osservati sono analoghi per ALT, AST, γ-GT, Calcio, Fosforo, Sodio, Potassio, Cloro, ma appaiono più bassi per proteine totali, globuline, glucosio, bilirubina totale, ALP, urea, creatinina, Magnesio, Ferro e più alti per albumina, colesterolo, LDH, Rame.

CONCLUSIONI

Sebbene la numerosità del campione da noi utilizzato non sia elevata, gli intervalli calcolati possono rappresentare un punto di partenza per ottenere un valido riferimento per la clinica. I risultati ottenuti verranno ampliati in futuro con l'inserimento nello studio di altri soggetti adeguatamente selezionati e appartenenti anche ad altre categorie zootecniche dell'allevamento suinicolo.

Bibliografia

Arantes V., Ribeiro P.R., Borges A., Marcelino E.L., Barros V., Ribeiro F.M., Mundim A.V., Tavares M. (2004) "Glucose, cholesterol and triglycerides of gestating sows". In: "Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress", Amburgo, Germania, 27 giugno – 1 luglio 2004, 626.

Boyd J.W. (1983) "The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals". Vet Clin Pathol. 12, 9-24.

Dorner J.L., Hoffmann W.E., Filipov M.M. (1983) "Effect of in vitro haemolysis on values for certain porcine serum constituents". Vet Clin Pathol. 12, 15-19.

Dubreuil P., Couture Y., Tremblay A., Martineau G.P. (1990) "Effects of experimenters and different blood sampling procedures on blood metabolite values in growing pigs". Can J Vet Res. 54, 379-382.

Dubreuil P., Lapierre H. (1997) "Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves". Can J Vet Res. 61, 235-239.

Egeli A.K., Framstad T., Morberg H. (1998) "Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets". Acta Vet Scand. 39, 381-393.

Elbers A.R.W., Geudeke M.J., van Rossem H., Kroon M.C., Counotte G.H.M. (1994) "Haematology and biochemistry reference values for sows kept under modern management conditions". Vet Q. 16, 127-130.

Faustini M., Munari E., Colombani C., Russo V., Maffeo G., Vigo D. (2000) "Haematology and plasma biochemistry of Stamboek pre-pubertal gilts in Italy: reference values". J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 47, 525-532.

Faustini M., Scocca S., Riccardi A., Munari E., Colombani C., Russo V., Maffeo G., Vigo D. (2002) "Indicazioni su alcuni aspetti ematologici, ematochimici e della funzione riproduttiva in scrofette". Archivio Veterinario Italiano. 53, 41-51.

Framstad T., Havre G.N., Morberg H. (1989) "The effect of storage, separation and use of heparin on the clinical biochemical analysis of pig blood". Norsk Vet.-T. 101, 237-243.

Framstad T., Morberg H., Aass R.A. (1991) "Clinical biochemical analyses of pig blood. Reference ranges for sows". Norsk Vet.-T. 103, 807-815.

Friendship R.M., Lumsden J.H., McMillan I., Wilson M.R. (1984) "Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine". Can J Comp Med. 48, 390-393.

Friendship R.M., Henry S.C. (1992) "Cardiovascular system, haematology and clinical chemistry". In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.G. (ed.) "Diseases of Swine", 7th ed., Ames, Iowa, Iowa State University Press, 3-11.

Gresham A.C.J. (1994) "Porcine clinical biochemistry". Pig Vet J. 32, 58-67.

Groth Von W., Kalrchreuter S., Hahn R. (1986) "Influence of breed, age, season and change of housing on enzyme activity and mineral and urea concentrations in blood plasma of boars" Teil 1. Tierärztl. Umsch. 41, 652-658.

Groth Von W., Kalrchreuter S., Hahn R. (1986) "Influence of breed, age, season and change of housing on enzyme activity and mineral and urea concentrations in blood plasma of boars". Teil 2. Tierärztl. Umsch. 41, 778-787.

Heath M.F., Evans R.J., Gresham A.C.J. (1991) "Blood biochemical reference ranges for sows under modern management conditions". Br Vet J. 147, 331-339.

Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. (1997) "Clinical biochemistry of domestic animals", 5a ed., San Diego, Academic Press.

Lippi G., Salvagno G.L., Montagnana M., Brocco G., Guidi G.C. (2006) "Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing". Clin Chem Lab Med. 44, 311-316.

Morris R.S. (1998) "The veterinarian and the livestock industries - fire in the hearth or smoke in the eyes?". N Z Vet J. 36, 161-166.

Odink J., Smeets J.F., Visser I.J., Sandman H., Snijders J.M. (1990) "Hematological and clinicochemical profiles of healthy swine and swine with inflammatory processes". J Anim Sci. 68, 163-70.

Prasad P.E., Dilip Kumar G. (2002) "Serum enzyme profile and biochemical constituents of blood in cross-bred pigs during growth". Indian Vet J. 79, 1141-1144.

R, The R Project for Statistical Computing.
Disponibile all'indirizzo: http/ www.r-project.org

Reese D.E., Peo E.R., Lewis A.J., Hogg A. (1984) "Serum chemical values of gestating and lactating swine: reference values". Am J Vet Res. 45, 978-80.

Tewes H., Steinbach J., Smidt D. (1979) "Investigation on the blood composition of sows during the reproductive cycle. Blood changes during lactation". Zuchthyg. 14, 111-116.

Tumbleson M.E., Schmidt D.A., Scholl E. (1986) "Hematology and clinical chemistry" in: Leman A.D. "Diseases of Swine", 6a ed., Ames, Iowa, The Iowa State University Press, 20-44.

Verheyen A.J.M., Maes D.G., Mateusen B., Deprez P., Janssens G.P., de Lange L., Counotte G. (2007) "Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows". Vet J. 174, 92-98.

Wilson G.D., Harvey D.G., Snook C.R. (1972) "A review of factors affecting blood biochemistry in the pig". Br Vet J. 128, 596–610.

FATRO

La salute animale per la salute dell'uomo

L'uomo ha bisogno degli animali per la compagnia e per la nutrizione, e questi animali devono essere sani: i primi perchè vivono in casa, i secondi perchè devono nutrire senza rischi.

Il mantenimento della salute degli animali è il nostro lavoro, delicato, meticoloso, svolto con apparecchiature scientifiche e macchinari perfetti, in locali ad aria variamente controllata, soprattutto per quanto riguarda l'eventuale necessità di sterilità dell'aria stessa: il tutto in un ambiente gradevole e distensivo.

Questi sono i nostri concetti, che ci fanno lavorare con entusiasmo e che cerchiamo di trasmettere ai tanti nostri Collaboratori nel mondo.

IL GRUPPO FATRO

stabilimenti di produzione in Italia

- **FATRO** - Ozzano Emilia - Bologna
- **FATRO-ATI/FOSCHI** - Ozzano Emilia - Bologna
- **FATRO-NEUVA** - Maclodio - Brescia

stabilimenti di produzione all'estero

- **FATRO-POLSKA** - Wrocław (Polonia)
- **FATRO-VON FRANKEN** - Buenos Aires (Argentina)
- **BIOPHARM** *Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a.s.* Praga (Repubblica Ceca)

altre filiali

- **FATRO-AVICO** - Atene (Grecia)
- **FATRO-IBÉRICA** - Barcellona (Spagna)
- **FATRO-FEDAGRO** - Montevideo (Uruguay)
- **FATRO-STALLEN** - Mumbai (India)
- **FATRO-INTERMED** - Agenzie nel mondo

info prodotti:
www.fatro.it

FATRO - industria farmaceutica veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO)
Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512728 - www.fatro.it - e.mail:info@fatro.it

LA SALUTE ANIMALE PER LA SALUTE DELL'UOMO
FATRO

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTE (MRSA): SURVEY AL MACELLO SU ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA): SURVEY AT SLAUGHTER AMONG HOLDINGS FROM ITALY

ALESSIA FRANCO[1], GIUSEPPE MERIALDI[2] , MANUELA IURESCIA1, FABIOLA FELTRIN[1], RANIERO LORENZETTI1, MAURIZIO ZINI[1], ANGELA IANZANO[1], ROBERTA AMORUSO[1], CARMELA BUCCELLA1, OLIVIERO BASSOLI[4], GIUSEPPE CITO3, GIORGIO CUOGHI[4], ALESSANDRO DE BASSA[4], ELENA FLORIANI[5], VITANTONIO PERRONE[3], PIETRO RAZZINI[5], GAETANO LIUZZO[4] E ANTONIO BATTISTI[1]

[1] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma***
[2] ***Sezione di Bologna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna***
[3] ***Servizio Veterinario ASL Roma B***
[4] ***Servizio Veterinario ASL Modena***
[5] ***Servizio Veterinario ASL Mantova***

Parole chiave: MRSA, suini, zoonosi, survey

Key Words: MRSA, pigs, zoonosis, survey

Riassunto. Nel corso del 2008, è stato condotto uno studio trasversale in suini con lo scopo di stimare la prevalenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) negli allevamenti da carne, attraverso il campionamento di gruppi di animali avviati al macello, e caratterizzarne gli isolati presenti. E' stata riscontrata una prevalenza tra gli allevamenti del 38% (CI 29-47%, 95% CL). Dati preliminari sulla caratterizzazione molecolare degli isolati suggeriscono eterogeneità tra MRSA circolanti negli allevamenti, all'interno del complesso clonale 398. I risultati dimostrano che cloni di MRSA hanno trovato una nicchia ecologica negli allevamenti suini italiani, analogamente a quanto osservato in alcune altre aree europee ed extraeuropee.

Abstract. A survey to estimate the prevalence of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among holdings of fattening pigs was conducted in Italy in 2008. Herds were selected by a random sampling procedure and sampled at different slaughterhouses of northern and central Italy. Nasal swabs from batches of animals from each holding enrolled were randomly sampled (double-stage sampling technique). Suspect isolates from pooled primary cultures were cloned and subsequently screened by PCR for species identification and for the *mecA* gene. Positive isolates were submitted to spa-typing and SCCmec typing, according to international consensus protocols. Among the herds surveyed (n=118), a prevalence of 38% was estimated (CI 29-47%, 95% CL). The Italian pig isolates showed heterogeneity

within the 398 Clonal Complex. Preliminary molecular data on isolates from the survey confirms that MRSA CC398 has found an ecological niche among Italian pig holdings and now it is widespread among Italian fattening pig population, a condition already demonstrated in some other countries, included some Member States of the European Community.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) è una causa importante nell'Uomo di infezioni nosocomiali in tutto il mondo e negli ultimi anni in vari paesi si è assistito all'emergenza simultanea di cloni anche nella comunità. Tali agenti non sono contrastabili attraverso terapia con beta-lattamici (e frequentemente con altre classi di antimicrobici) e persistono in infezioni localizzate con possibile esito di generalizzazione in particolari condizioni (1, 2).
La recente emergenza di cloni MRSA in suini allevati in alcuni paesi del Centro Europa e del Nord America ha destato preoccupazione soprattutto in seguito all'evidenza di trasmissione a categorie professionali associate all'allevamento suino (3, 4, 5). In Italia, non sono mai state intraprese indagini nella popolazione suina adeguate all'acquisizione di informazioni su presenza e diffusione di tale agente.
Con tali premesse, nel corso del 2008 è stato condotto uno studio trasversale in suini con lo scopo di stimare la prevalenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente negli allevamenti da carne, attraverso il campionamento di animali avviati al macello, e caratterizzarne gli isolati presenti.
Lo studio si proponeva di integrare con informazioni alla fine della filiera produttiva le informazioni da raccogliersi nel corso del 2008 negli allevamenti di suini riproduttori e produttori, secondo quanto previsto dalla Dec. Comm. 55/2008/EC (6).

MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati nello studio trasversale 118 allevamenti di suini (orientamento produttivo: produzione da ingrasso e ingrasso) sul territorio italiano, provenienti prevalentemente da allevamenti del nord e del centro Italia (primary sample size).
Il campionamento individuale degli animali per ogni allevamento (secondary sample size) è stato effettuato all'arrivo dei lotti degli animali al macello, con numerosità tale da fornire adeguata sensibilità diagnostica alla survey, e con lo scopo di determinare lo status di positività o negatività dell'allevamento di provenienza, con un livello di confidenza adeguato alle necessità dello studio.
Le prove colturali e quelle di caratterizzazione molecolare degli isolati hanno seguito protocolli di consenso europei ed internazionali.

RISULTATI

Sono risultati positivi per MRSA 45 lotti di animali provenienti da altrettanti allevamenti, sui 118 arruolati allo studio (38%, CI 29-47%, 95% CL). La preliminare

caratterizzazione molecolare degli isolati, non ancora definitiva, suggerisce eterogeneità all'interno del complesso clonale 398 associato al suino.
Le frequenze di isolamento dai pool di tamponi nasali esaminati per allevamento e gli spa-type finora riscontrati sono riportati in Figura 1 e Tabella 1, rispettivamente.

Figure 1: Distribution of holdings with one or more positive pools detected, Italy, 2008 (pools n=707)

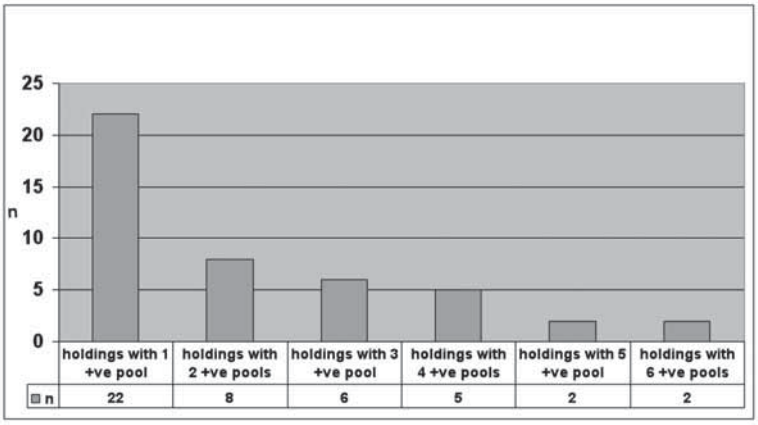


Table 1:Spa-types associated (preliminary)

Spa type
t011
t034
t108
t1730
t2922
t899

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Staphylococcus aureus meticillino-resistente sembra aver trovato una nicchia ecologica negli allevamenti di suini italiani, analogamente a quanto già osservato dal 2007 in alcuni Stati Membri della Comunità Europea e nel Nord-America.
Lo studio di popolazione dei cloni circolanti negli allevamenti da ingrasso e la loro caratterizzazione molecolare, alla fine del segmento delle produzioni primarie della

filiera suinicola, sarà prezioso nel settore zoonosi per studi comparativi di epidemiologia a carattere nazionale, comunitario ed internazionale. Sarà inoltre prezioso anche per studi comparativi con quanto attualmente circolante nel settore dei suini riproduttori e produttori, ovvero la popolazione di studio identificata dal baseline study comunitario e per possibili opzioni di gestione del problema.

ACKNOWLEDGEMENTS:

Gli Autori ringraziano il personale della Direzione Operativa Diagnostica Generale, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, per il supporto tecnico fornito: Alessandra Di Egidio, Cinzia Onorati, Valentina Donati, Serena Lorenzetti, Roberta Onorati, Tamara Cerci, Luigi Sorbara, Gessica Cordaro, Paola Di Matteo

Bibliografia:

1. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Degener JE, Lyytikäinen O, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999–2002*. Emerg Infect Dis. 2004;10:1627–34
2. Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clin Microbiol Infect. 2006;12(Suppl 1):9–15.
3. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Infect Dis. 2005;11:1965–6.
4. van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ,Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC. Transmission of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Vet Microbiol. 2008
5. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol. 2008;128:298–303.
6. Official Journal of the European Union. COMMISSION DECISION 55/2008 of 20 December 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of Salmonella spp. and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in herds of breeding pigs to be carried out in the Member States.
7. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:014:0010:0025:EN:PDF
   (accessed on 6 february 2009)

STUDIO LONGITUDINALE: RAPPORTO TRA STADIO DEL CICLO RIPRODUTTIVO, NUMERO DI PARTI ED ELIMINAZIONE FECALE DI *SALMONELLA* SPP. NELLE SCROFE.

REPROD*UCTIVE CYCLE, NUMBER OF PARITIES AND FECAL SALMONELLA* SPP. EXCRETION IN SOWS: A LONGITUDINAL STUDY

MAGISTRALI CHIARA FRANCESCA[1], D'AVINO NICOLETTA [1], CIUTI FRANCESCA [1], CUCCO LUCILLA [1], MARESCA CARMEN [1], PANICCIÀ MARTA 1, PETRINI STEFANO 1, SCOCCIA ELEONORA [1], TENTELLINI MICHELE [1], VALLI BEATRICE [1], VISCHI ORLANDO [2], PEZZOTTI GIOVANNI [1].

[1] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy***
[2] ***Veterinario libero professionista***

Parole chiave: *Salmonella*, suino, gravidanza, eliminazione

Key words: *Salmonella*, swine, pregnancy, excretion

Riassunto. Scopo del lavoro è stato valutare, tramite uno studio di coorte, l'escrezione fecale di *Salmonella* in scrofe, con numeri di parti diversi, in diverse fasi del ciclo riproduttivo, in 2 allevamenti a ciclo chiuso del centro Italia. La popolazione target era costituita da primipare, pluripare con 1-5 parti e pluripare con più di 5 parti. Sono state considerate positive le scrofe dalle cui feci è stata isolata (ISO 6579:2002) *Salmonella* a diversi stadi di gestazione: preparto (14 giorni circa prima del parto), postparto1 (2-5 giorni dopo il parto), postparto2 (20 giorni circa dal parto), gestazione (24-31 giorni dopo il parto). E' stata calcolata la densità d'incidenza in giorni per singolo momento fisiologico e l'incidenza cumulativa (L.C. 95%) per le 4 fasi considerate.
Sono stati esaminati campioni ambientali prelevati dalle sale parto e box di gestazione, prima della introduzione degli animali. Gli isolati sono stati sierotipizzati (Kauffmann e White).
Nel preparto 1 animale è risultato positivo per *Salmonella*, nel postparto1 3 scrofe, nel postparto 26 scrofe e nella gestazione 27 scrofe. La densità di incidenza per *Salmonella* è risultata di 0.007 giorni per le primipare di 0,005 per le pluripare e di 0,001 per le pluripare>5. L'incidenza cumulativa è risultata dello 0,6% (I.C.95%=0%-2%) nel preparto, del 2% (I.C.95%=0%-4%) nel postparto1, del 4% (I.C.95%=1%-8%) nel postparto2 e del 27% (I.C.95%=18%-36%) nella gestazione. I sierotipi isolati sono stati Munchen e Typhimurium (primo allevamento) e 4,5,12:i- e Choleraesuis (secondo allevamento).
Dei tamponi ambientali effettuati sono risultati positivi per *Salmonella* spp 5/62 (8%) nelle sale parto e 28/120 (23%) nelle sale gestazione. Sono state isolate nel primo allevamento S. Munchen; nel secondo, Salmonella 4,5,12:i- e S. Typhimurium var. Copenhagen.

La velocità con la quale gli animali si infettano per *Salmonella*, così come evidenziato dalle stime di incidenza è massima negli animali più giovani e decresce all'aumentare dei numeri di parto. La gestazione è risultata essere un momento critico per l'escrezione di *Salmonella* spp. nelle scrofe probabilmente a causa di un *challenge* ambientale.

Abstract. The aim of the study was to evaluate, in a cohort study, the fecal excretion of *Salmonella* spp. in sows with different number of parities, in distinct periods of the reproductive cycle. Two integrated farms in central Italy have been included in the study. The target populations (166 animals) were primaparous and multiparous (1-5 and more than 5 parities) sows, tested in different periods of the reproductive cycle: 14 days before partuition (pre-partum) 2-5 days (post partum 1) and 20 days after partuition and gestation (24-31 days post partum). The subjects have been considered positive if *Salmonella* was isolated from faeces (according to ISO 6579:2002 standard). *Salmonella* isolates have been serotyped according to the Kauffmann White scheme. The density of incidence in days have been calculated for each period of the reproductive cycle and the cumulative incidence for the 4 periods considered has been also calculated.
In addition, environmental samples have been collected for farrowing rooms and gestation boxes, before the introduction of the sows.
During the pre-partum one single sow resulted positive, three during the post partum 1, six in the post partum 2 and 27 in the gestation.
The incidence density for *Salmonella* was 0,007 days for the group of primiparous sows, 0,005 days for the pluriparous (1-5) and 0,0001 days for the group with more than 5 parities.
The cumulative incidence resulted 0,6 % (I.C.95%=0%-2%) in pre-partum, 2% (I.C.95%=0%-4%) in post partum 1, 4% (I.C.95%=1%-8%) post partum 2 and 27% (I.C.95%=18%-36%) in gestation.
S. Munchen and S. Typhimurium were isolated from the sows in the first farm, while S. Choleraesuis and 4,5,12:i- were the two serotypes found in farm 2.
Salmonella was also isolated from the environmental samples collected in the farrowing rooms (5 out of 62; 8%) and the gestation boxes (28 out of 120; 23%).
S. Munchen was isolated from the first farm while *Salmonella* 4,5,12:i- and S. Typhimurium var. Copenhagen were isolated in the second farm.
The incidence values demonstrate that young sows tend to infect more rapidly than the older ones. Moreover, gestation represents a critical period for the excretion of *Salmonella*, probably related to environmental challenge.

INTRODUZIONE

Salmonella rappresenta ancora uno dei principali agenti di malattia di origine alimentare nell'uomo. Anche se il report EFSA 2007 (EFSA 2009) segnala un calo nel numero di casi di salmonellosi umana, questa rimane, con i suoi 151,995 casi registrati, la seconda zoonosi dopo la campilobatteriosi in Europa (EFSA 2009).
La carne suina, dopo la carne di pollo e le uova, è considerata una delle maggiori fonti di infezione per l'uomo, con l'1,1% di campioni di carne fresca positivi nel corso del 2007 (EFSA, 2009). La prevalenza osservata a livello linfonodale nei suini al macello è stata dello 10,3% all'interno dell'Unione Europea e di 16.5% in Italia nell'indagine

effettuata tra 2006 e 2007 in base a quanto previsto dal Regolamento (CE) 2160/2003 (EFSA 2008). Al fine di ridurre l'incidenza della salmonellosi nella Comunità Europea, sono allo studio interventi nei diversi settori della filiera della carne suina: l'approccio alla filiera nella sua globalità è infatti a tutt'oggi la strategia indicata per ottenere una riduzione della contaminazione nel prodotto finito.
Numerosi studi sono stati condotti a diversi livelli del processo produttivo (allevamento o *pre harvest*, trasporto o *harvest*, macellazione e trasformazione, *post-harvest*) per chiarire l'epidemiologia dell'infezione salmonellare ed individuare misure di controllo efficaci ed attuabili nella pratica.
Per quanto riguarda la fase di *pre-harvest*, sono state descritte numerose vie di trasmissione per i suini, e nonostante l'ambiente e la contaminazione indiretta rivestano un ruolo importante, alcuni studi hanno indicato come le scrofe possano giocare un ruolo nel mantenimento dell'infezione, in particolare negli allevamenti a ciclo chiuso, dove i contatti tra il settore riproduttivo e l'ingrasso sono generalmente più frequenti e protratti (Nollet, 2005). Gli animali portatori sono infatti considerati la fonte principale di infezione, sia per via diretta che per via indiretta, per gli altri animali (Carlson, 2001). In questo scenario, analogamente a quanto già effettuato nella filiera avicola, all'interno della Comunità si sta valutando la possibilità di intervenire sulle fasi 'alte' della filiera, cioè sui riproduttori, per ridurre la prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti (EFSA, 2008).
Questo studio si proponeva lo scopo di indagare le dinamiche della infezione salmonellare in scrofe appartenenti a due allevamenti a ciclo chiuso dell'Italia centrale, e più in particolare, di delineare le correlazioni esistenti tra infezione, età degli animali e stadio del ciclo riproduttivo.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nel periodo Dicembre 2006 – Novembre 2007 in due allevamenti a ciclo chiuso presenti in centro Italia. La popolazione target è stata suddivisa in scrofe primipare, pluripare con 1-5 parti e pluripare con più di 5 parti. Sono state considerate positive le scrofe dalle cui feci è stata isolata *Salmonella* a diversi stadi di gestazione: preparto (14 giorni circa prima del parto), postparto1 (2-5 giorni dopo il parto), postparto2 (20 giorni circa dal parto), gestazione (24-31 giorni dopo il parto).
Nei due allevamenti è stata selezionata una coorte di 166 animali, di cui 102 sono stati oggetto di campionamento per l'intero periodo previsto dallo studio. Gli animali sono stati identificati singolarmente con una marca auricolare, in maniera da poter essere seguiti lungo l'arco del ciclo riproduttivo. Sono stati campionati più gruppi di scrofe, appartenenti a bande differenti, e lungo tutto l'arco dell'anno solare.
I soggetti sono stati suddivisi come indicato in tabella 1. Per ciascun animale è stato effettuato un prelievo individuale di feci, approssimativamente 25 grammi, dall'ampolla rettale. In aggiunta sono stati prelevati 182 campioni ambientali dalle sale parto (#62) e gestazione (#120), mediante spugnette (sponge bags), strofinate sulle superfici (pareti, divisori dei box, pavimenti, gabbie parto, beverini, mangiatoie) prima dell'introduzione degli animali oggetto di campionamento.
Tutti i campioni prelevati sono stati conservati individualmente in contenitori sterili e mantenuti a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'analisi.

Per la ricerca di *Salmonella* da campioni fecali ed ambientali è stata seguita procedura descritta nella norma ISO 6579/2002. Per ciascun campione fecale positivo è stata isolato almeno un ceppo di Salmonella da sottoporre a sierotipizzazione secondo lo schema di Kauffman - White; da ciascun tampone ambientale positivo sono stati tipizzati cinque ceppi di *Salmonella* spp. Infine, i ceppi provenienti dal secondo allevamento sono stati ulteriormente discriminati mediante PFGE.
La PFGE è stata effettuata in base al protocollo Salmgene (Peters, 2003):la restrizione del DNA batterico è stata eseguita impiegando enzima XbaI (Promega).Le immagini ottenute sono state successivamente elaborate utilizzando il programma BIONUMERICS.
L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata calcolando la densità d'incidenza in giorni per singolo momento fisiologico e l'incidenza cumulativa (L.C.95%) per le 4 fasi considerate.

RISULTATI

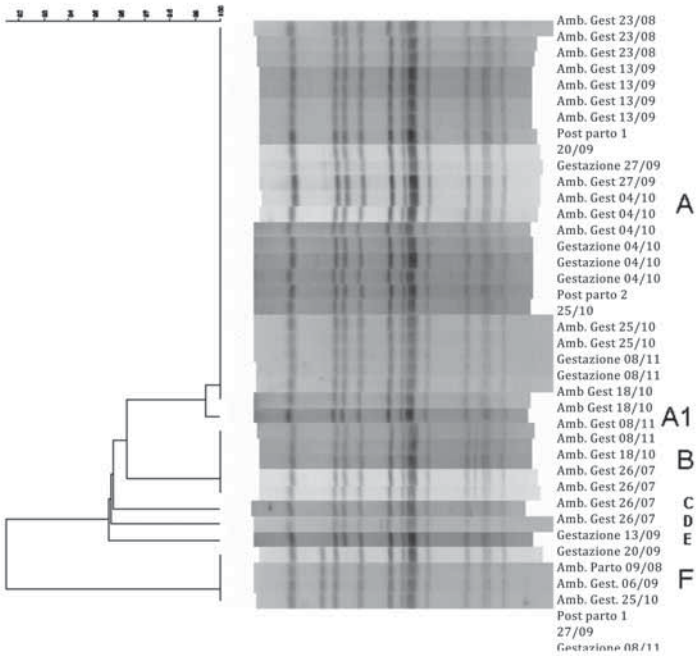
Nella fase di preparto, un animale è risultato positivo per *Salmonella*, nel postparto1, tre scrofe, nel postparto2, sei scrofe e nella gestazione ventisette scrofe. La densità di incidenza per *Salmonella* è risultata di 0.007 giorni per le primipare di 0,005 per le pluripare e di 0,001 per le pluripare>5.
L'incidenza cumulativa è risultata dello 0,6% (I.C.95%=0%-2%) nel preparto, del 2% (I.C.95%=0%-4%) nel postparto1, del 4% (I.C.95%=1%-8%) nel postparto2 e del 27% (I.C.95%=18%-36%) nella gestazione. I sierotipi isolati sono stati Munchen e Typhimurium (primo allevamento) e 4,5,12:i- e Choleraesuis (secondo allevamento).
Dei tamponi ambientali effettuati sono risultati positivi per *Salmonella* spp 5/62 (8%) nelle sale parto e 28/120 (23%) nelle sale gestazione. Sono state isolate nel primo allevamento S. Munchen; nel secondo, *Salmonella* 4,5,12:i- e S. Typhimurium var. Copenhagen.
I ceppi di Salmonella 4,5,12:i- sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante PFGE e i profili ottenuti analizzati mediante BIONUMERICS. L'albero filogenetico ottenuto è illustrato in Figura 1.

DISCUSSIONE

Complessivamente, il 6,6% dei campioni di feci prelevati dalle scrofe, indipendentemente dal numero di parto e dal momento del ciclo riproduttivo, hanno fornito esito positivo al test batteriologico. Questo conferma quanto osservato da altri autori che hanno registrato percentuali di positività all'esame batteriologico non superiori al 10% nelle scrofe (Kranker, 2003; Nollet, 2005). Per quanto riguarda i sierotipi isolati, nel corso di questo lavoro sono state isolate S. Typhimurium, S. Muenchen nel primo allevamento e S. Choleraesuis e S. 4,5,12:i- nel secondo. S. Typhimurium e S. 4,5,12:i-, si collocano rispettivamente al primo ed al quarto posto tra i sierotipi isolati nella Comunità Europea nei suini al macello (EFSA 2008). Questo elemento appare importante in rapporto alle finalità dello studio; è infatti noto che le caratteristiche epidemiologiche di un sierotipo di *Salmonella* possano essere differenti da quelle di un altro. Dati che si riferiscano ai sierotipi più diffusi nel suino e più importanti rispetto alla salute umana hanno perciò più immediato riscontro per identificare misure in grado di contenere il rischio di infezioni trasmesse dagli alimenti (Funk, 2001). Più autori hanno segnalato che l'eliminazione di Salmonella può variare tra un gruppo e

Figura 1: albero filogenetico in PFGE riferito agli isolati di Salmonella 4,5,12:i- nel secondo allevamento

Figure 1: PFGE profiles of the Salmonella 4,5,12:i- isolates from the second herd



l'altro di scrofe ed è stagionale (Funk, 2001; Carlson, 2001; Lurette, 2008); per questo motivo, la coorte è stata composta da animali appartenenti a bande diverse e il campionamento è stato effettuato lungo tutto il corso dell'anno solare.

Dall' analisi dalle frequenze semplici è possibile osservare come gli animali più anziani presentino percentuali di escrezione inferiori. L' elaborazione statistica appare confermare questo dato: la velocità con la quale gli animali si infettano per *Salmonella*, infatti, così come evidenziato dalle stime di incidenza, è massima negli animali più giovani e decresce all'aumentare dei numeri di parto. Questo dato è in accordo a quanto osservato da Nollet et al. nel 2005, e può essere attribuito ad una maggiore copertura del sistema immunitario nelle scrofe più anziane.

Per quanto riguarda i diversi stati del ciclo riproduttivo, l'analisi delle percentuali di scrofe eliminatici di *Salmonella* indica la gestazione come il momento più a rischio per l'escrezione, come già segnalato da altri autori (Nollet, 2005, Funk, 2001).

Anche in questo caso, l'analisi statistica ha permesso di confermare queste osservazioni, dal momento che l'incidenza cumulativa è decisamente superiore in gestazione rispetto alle altre fasi del ciclo riproduttivo. Il fatto che la gestazione costituisca un momento a rischio per l'eliminazione di *Salmonella* è stata attribuita a diversi fattori, tra cui il diverso livello di igiene delle strutture rispetto alle sale parto, e la presenza di stress legati allo svezzamento. Funk e coll. (2001) hanno ipotizzato che anche il contenuto in acqua delle feci, maggiore in lattazio-

ne rispetto alla gestazione, possa avere un'influenza sulla maggiore escrezione di *Salmonella* in questo periodo.
Nel corso di questo lavoro, i dati del campionamento ambientale indicano una maggiore contaminazione delle sale gestazione, prima dell'introduzione degli animali oggetto di campionamento. Questo fatto può essere ricondotto a una diversa gestione dei due ambienti, infatti in tutte e due le aziende le sale parto vengono gestite in tutto pieno e tutto vuoto, mentre le sale gestazione sono gestite in flusso continuo. E' noto che la contaminazione residua di *Salmonella* in un ambiente influenza la prevalenza di suini eliminatori introdotti in quell'ambiente (Lurette, 2008).
Il fatto che le scrofe si infettino in sala gestazione può quindi essere giustificato da un maggiore challange ambientale e quindi da una trasmissione indiretta dell'infezione. Questo dato è confermato dalla corrispondenza tra i sierotipi isolati nei box gestazione e dalle scrofe introdotte successivamente negli stessi ambienti. A supporto di questa ipotesi infatti, nel primo allevamento S. Munchen è stata isolata nelle sale gestazione, e successivamente le scrofe trasferite in questo ambiente hanno eliminato lo stesso sierotipo nelle feci.
Nel secondo allevamento S. 4,5,12:i- è stata isolata a più riprese dagli ambienti e dagli animali, per cui la stessa correlazione non è dimostrabile. La caratterizzazione molecolare, effettuata tramite PFGE, non è infatti riuscita a discriminare i diversi stipiti di S. 4,5,12:i- circolanti. Poiché questa azienda effettuava una rimonta interna da anni è probabile che questo stipite circolasse nella popolazione di scrofe da tempo.

CONCLUSIONE

In conclusione il lavoro effettuato rafforza l'opportunità di una corretta gestione delle sale di gestazione per un efficace contenimento dell'infezione negli allevamenti suini da riproduzione. I risultati suggeriscono inoltre una corretta pianificazione delle rimonte, per evitare di avere un eccesso di soggetti al primo parto, maggiormente esposti alla infezione da Salmonella. In termini più direttamente legati alla contaminazione delle carni, deve essere sottolineato come la maggiore frequenza di soggetti positivi nella fase di gestazione possa rappresentare un rischio superiore per la contaminazione finale delle carcasse, considerato il fatto che proprio da questi settori originano gli animali da riforma destinati al macello.

Bibliografia

- Carlson, A.R., Blaha, T. (2001). In-herd prevalence of Salmonella in 25 selected Minnesota swine farms. Journal of Swine Health and Production. 9: 7-10.
- European Food Safety Authority. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to "Risk assessment and mitigation options of Salmonella in pig production". The EFSA Journal 341, 1 – 131.
- European Food Safety Authority. (2008). Report of the Task Force on Zoonoses data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: Salmonella prevalence estimates. The EFSA Journal 135,1-111.

- European Food Safety Authority. (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, The EFSA Journal 223.
- Funk J. A., Davies P. R., Nichols M. A. (2001). Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production system. Vet. Microbiol. 83. 45-60.
- Griffith R. W. (2006). Salmonella. In. Diseases of Swine. Straw B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor D. J. Blackwell Publishing. IX Edition. 739-754.
- Kranker, S., Alban, L., Boes, J.; Dahl, J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium infection in three Danish farrow to finish swine herds. Journal of Clinical Microbiology 41: 2282-2288.
- Lurette, A., Belloc, C., Touzeau, S., Hoch, T., Ezanno, P., Seegers, H., Fourichon, C. (2008). Modelling Salmonella spread within a farrow-to-finish pig herd. Vet. Res. 39:49
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. , De Zutter, L., Maes, D. (2005). *Salmonella* in sows : a longitudinal study in farrow to finish pig herds. Vet. Res. 36: 645-656
- Peters T.M., Maguire C., Threlfall E.J., Fisher I.S., Gill N., Gatto A.J., Salm-gene project (2003). "The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting". Euro Surveill. 8(2), 46-50.

Tabella 1: numeri di animali testati per Salmonella
Table 1: Animals tested for Salmonella

	CATEGORIA DI PARTO							
MOMENTO	Primipare		Pluripare		Pluripare>5		Totale	
	N	%	N	%	N	%	N	%
PREPARTO	45	27,8%	52	32,1%	65	40,1%	162	100,0%
POST PARTO1	42	27,3%	51	33,1%	61	39,6%	154	100,0%
POST PARTO2	38	27,5%	51	37,0%	49	35,5%	138	100,0%
GESTAZIONE	35	34,3%	44	43,1%	23	22,5%	102	100,0%

Tabella 2: Percentuale di animali e campioni risultati positivi per Salmonella
Table 2: Percentage of animals and samples positive for Salmonella

	Primipare		Pluripare		Pluripare > 5		Totale animali	
Momento	Testate	% positive	Testate	% positive	Testate	% positive	Testate	% positive
PREPARTO	45	0,6%	52	0,0%	65	0,0%	162	0,6%
POST PARTO1	42	1,9%	51	0,0%	61	0,0%	154	1,9%
POST PARTO2	38	0,7%	51	2,9%	50	0,7%	138	4,3%
GESTAZIONE	35	10,8%	44	12,7%	23	2,9%	102	26,5%
Totale campioni	160	10%	198	8,5%	198	2,0%	556	6,6%

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI TRE DIVERSI ANTIBIOTICI SULL'ECOLOGIA INTESTINALE E SU ALCUNI PARAMETRI PRODUTTIVI DI SUINETTI IN SVEZZAMENTO: DATI PRELIMINARI.

EFFECT OF THREE DIFFERENT ANTIBIOTICS ON COMMENSAL INTESTINAL MICROFLORA AND ON SOME PRODUCTIVE TRAITS: PRELIMINAR REPORT.

BOSI P.[2], MERIALDI G.[1] , BARDASI L.[1], SCANDURRA S.[3], VECCHI M.[3], FERRO P.[3], MESSORI S.[2], NISI I.[2], CASINI L.[2] , TREVISI P.[2]

[1] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Bologna***
[2] ***DIPROVAL, Università di Bologna***
[3] ***Elanco Animal Health, Div. Eli Lilly Italia, Sesto Fiorentino (FI)***

Riassunto. E' stato condotto uno studio sperimentale al fine di valutare l'impatto della somministrazione orale di tre diversi antibiotici sulla composizione della flora intestinale e su alcuni parametri produttivi in suinetti in svezzamento. Settantadue suinetti appena svezzati provenienti da una allevamento convenzionale sono stati inclusi nello studio che è stato condotto presso una struttura di stabulazione sperimentale. I suinetti sono stati divisi casualmente in 4 gruppi da 18 soggetti cadauno ed assegnati a 4 diverse diete: dieta da svezzamento convenzionale priva di antibiotici (controllo, C), dieta con inclusione di tilmicosina (T), dieta con inclusione di amoxicillina (A), dieta con inclusione di doxiciclina (D). La prova ha avuto una durata complessiva di quattro settimane, di cui tre di trattamento. Durante la prova ed al termine della stessa sono stati misurati parametri produttivi quali incremento ponderale giornaliero (IPG), assunzione di alimento (AI) e indice di conversione dell'alimento (ICA). Sono stati inoltre prelevati settimanalmente campioni di feci per valutare la concentrazione di enterobatteri e lattobacilli.
I soggetti che hanno ricevuto una dieta addizionata con antibiotico hanno mostrato un IPG e AI significativamente superiore al gruppo di controllo, senza modificare il parametro ICA. In media i tre antibiotici non hanno influenzato la concentrazione di lattobacilli, che però è stata maggiore con D e T rispetto ad A. Invece la concentrazione di Enterobatteri è stata fortemente ridotta nel gruppo alimentato con la dieta supplementata con tilmicosina.

Summary. An in vivo experiment was performed to study the effect of three different antibiotics on intestinal microflora composition and on some productive parameters and in weaned piglets. Seventy-two newly weaned conventional piglets were included and randomly assigned to 4 different diets: conventional weaning diet with no antibiotics (C), diet with tilmicosin supplementation (T), diet with amoxicillin supplementation (A) and diet with doxiciclin supplementation (D). The experiment had an overall duration of 4 weeks. Antibiotics were added to diets for 3 weeks. During the experiment and at its end, data about average daily gain (ADG) , feed intake (FI), and feed to gain ratio (FGR) were recorded. Fecal samples were collected weekly for *Enterobacteriaceae* and lactobacilli. The groups receiving an antibiotic supplemented diet had significantly

higher ADG and FI values, without any impact on FGR. Lactobacilli concentration did not result averagely impaired by antibiotics, but D and T increased it, as compared with A. Conversely *Enterobacteriaceae* were strongly reduced by the tilmicosin added diet.

INTRODUZIONE

L'utilizzo di mangimi medicati con l'additivazione di sostanze ad azione antibatterica per la terapia ed il controllo delle malattie respiratorie nei reparti svezzamento è una pratica assai comune negli allevamenti suinicoli italiani. Spesso questi trattamenti hanno lunga durata e possono protrarsi per settimane. In linea generale è noto che trattamenti antibiotici possono avere come effetti indesiderati l'insorgere di resistenze e alterazioni sfavorevoli della flora intestinale. Lo svezzamento rappresenta un momento molto critico per l'apparato gastroenterico del suinetto e determina cambiamenti significativi nella microflora e dei suoi metaboliti. In particolare lo svezzamento aumenta l'instabilità della microflora ed è necessaria più di una settimana per ristabilire un equilibrio favorevole nell'ecologia della flora commensale intestinale (Konstatinov et al., 2006). Appare evidente che, in un simile contesto, l'applicazione di un trattamento antibiotico indiscriminato possa rappresentare un potenziale aggravamento della situazione di criticità, potendo favorire lo sbilanciamento della flora intestinale verso popolazioni potenzialmente patogene, primi fra tutti gli enterobatteri a cui appartengono due fra i principali patogeni enterici del suino: *Escherichia coli e Salmonella spp.*. Un corretto equilibrio della flora commensale intestinale è infatti essenziale per stimolare e mantenere la capacità del suino nel discriminare fra la flora innocua o benefica e quella patogena o potenzialmente tale. In particolare il rapporto fra la concentrazione di lattobacilli ed enterobatteri appare di notevole importanza. Infatti, sebbene non siano stati mai chiaramente definiti meccanismi attraverso i quali le due classi di microrganismi interagiscono, molti interventi di tipo alimentare finalizzati a migliorare la salute dell'intestino del suino mirano a contenere le concentrazioni degli enterobatteri, favorendo la flora lattica (Mikkelsen et al, 2004, Canibe e Jensen, 2003, van Winsen et al., 2001, van Winsen et al., 2002) o mimandone gli effetti attraverso l'impiego di acidificanti (Canibe et al., 2005, Øverland et al., 2000). E' stata inoltre dimostrata la capacità di ceppi di lattobacilli nell'inibire l'aderenza di Escherichia coli nel tratto intestinale (Spencer e Chesson,1994). La microflora lattica del suino può avere in definitiva un ruolo protettivo nei confronti degli enterobatteri patogeni (*Escherichia coli e Salmonella*) . Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare questo effetto: la competizione per siti recettoriali (Anderson et al., 1999), la produzione di batteriocine, la produzione di acidi grassi volatili (VFA: acetato, butirrato e propionato) e acido lattico. Le forme indissociate dei VFA e dell'acido lattico, in particolare, sarebbero in grado di penetrare la parete degli enterobatteri. Una volta all'interno della cellula, l'acido si dissocia determinando una brusca riduzione del pH intracellulare, risultante in una alterazione permanente del metabolismo batterico (van Winsen 2001, Russel e Diez-Gonzalez, 1998). Vari studi hanno utilizzato la numerazione di enterobatteri e Lattobacilli da diversi tratti del contenuto intestinale per valutare lo stato di salute della microflora intestinale. L'utilizzo del materiale presente nel lume rettale o delle feci per questo tipo di valutazioni rappresenta un mezzo di facile applicazione e consente di osservare i suini per lungo tempo riducendo il numero dei soggetti da includere negli studi e da sacrificare. In particolare, per quanto riguarda gli

enterobatteri, vari Autori sostengono che esiste una ottima correlazione fra le cariche presenti nei primi tratti intestinali e nelle feci (van Winsen et al. 2001, van Winsen et al. 2002, Canibe e Jensen, 2003,). Recenti studi (Collier et al, 2003) hanno indicato che la somministrazione di antibiotici nel suinetto riduce la concentrazione e la variabilità della microflora intestinale determinando un effetto che, seppur potenzialmente favorevole dal punto di vista dell'utilizzo energetico dell'alimento, potrebbe indebolire la risposta dell'ospite nei confronti di agenti nocivi di varia origine. Secondo questi stessi Autori l'effetto sulla microflora commensale non è costante per tutte le molecole ma può differire in base alla categoria di antibiotico somministrato.
Sulla base di questi presupposti, che evidenziano l'importanza della microflora lattica in rapporto agli enterobatteri, si è voluto valutare l'impatto di diversi trattamenti antibiotici in suinetti svezzati sull'ecologia microbica intestinale e sull'eventuali ricadute sulle performance produttive.

MATERIALI E METODI

Settantadue suinetti appena svezzati di 24 giorni di vita, provenienti da un allevamento convenzionale sono stati stabulati presso una struttura sperimentale. Il giorno dell'arrivo i soggetti sono stati suddivisi casualmente in 4 gruppi di 18 suinetti. A ciascun gruppo è stata assegnata una delle seguenti diete: dieta convenzionale per suinetti svezzati senza aggiunta di antibiotici (dieta C); dieta C addizionata di tilmicosina (Pulmotil TM®) in ragione di 400 mg/Kg (dieta T); dieta C addizionata di doxiciclina (Pulmodox ®) in ragione di 300 mg/Kg (dieta D) e dieta C addizionata di amoxicillina (Gammamix ®) in ragione di 400 mg/Kg (dieta A).
La prova ha avuto una durata complessiva di 4 settimane; 12 soggetti per ciascun gruppo sono stati mantenuti per 3 settimane e 6 per gruppo per 4 settimane. Le diete sono state mantenute differenti per le prime 3 settimane, nella quarta settimana tutti i soggetti rimasti in sperimentazione sono stati alimentati con la dieta di controllo per valutare gli effetti residui delle diverse supplementazioni. I soggetti sono stati stabulati individualmente. Ogni animale è stato pesato settimanalmente ed è stata registrata l'assunzione di alimento.
Ai giorni 0,7,14, e 21 sono stati raccolti campioni di feci individuali che sono stati posti in brodo BHI (rapporto 1:10) supplementato di glicerolo (10%) ed immediatamente congelati a -20°C. Giornalmente è stato eseguito e registrato un controllo visivo sull' eventuale aumento di contenuto idrico delle feci. Al giorno 21 è stato prelevato un campione di sangue da ciascun soggetto per la determinazione del contenuto in IgA e IgM. Il giorno del sacrificio da ogni suino è stato misurato il peso a pieno e a vuoto del piccolo intestino e sono stati inoltre raccolti un campione di contenuto del digiuno per le determinazioni batteriologiche e campioni della parete del piccolo intestino al 25% ed al 75% dell'estensione dello stesso per la misurazione dell'altezza dei villi e della profondità delle cripte.
I campioni di feci sono stati sottoposti a numerazione di lattobacilli ed *Enterobacteriaceae* tramite *piastratura* di diverse diluizioni decimali rispettivamente su Terreno MRSA (37°C, 72 h, 10% CO2) e VRBGA (37°C, 24 h).
La concentrazione di IgA e IgM è stata saggiata tramite un test ELISA (Bosi et al., 2007).

Una aliquota dei campioni di contenuto del digiuno è stata congelata per approfondimenti biomolecolari (DGGE) sulla ecologia e sulla variabilità della flora intestinale nei diversi gruppi di trattamento.
I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza con la procedura GLM del programma SAS (SAS Inst. inc., Cary, NC), considerando l'effetto della dieta e la nidiata. Sono stati effettuati i seguenti confronti ortogonali tra le diete: l'effetto della supplementazione antibiotica in generale (C *vs.* T+A+D), l'effetto di tilmicosina (T *vs.* A+D) ed il diverso effetto degli altri due antibiotici (A *vs.* D).

RISULTATI

Al momento della stesura di questo report preliminare non tutte le analisi programmate sono state terminate, pertanto saranno illustrati e discussi esclusivamente i dati relativi a: determinazioni batteriologiche sui campioni fecali, parametri zootecnici, determinazioni delle IgA e delle IgM dal sangue periferico, calcolo del peso relativo del piccolo intestino a vuoto e del peso relativo del contenuto intestinale.
Durante tutta la sperimentazione gli animali hanno presentato un ottimo stato di salute e nessuna differenza è stata osservata fra i diversi gruppi in termini di presenza di diarrea o alterazioni del fecal score. Un suino della dieta T è morto in seguito ad un trauma durante la terza settimana di sperimentazione. Prima dell'incidente la crescita del suinetto era stata sovrapponibile a quella media osservata nel suo gruppo. In ogni caso i dati relativi a questo soggetto non sono stati inclusi nelle valutazioni.
I dati relativi alle concentrazioni di enterobatteri e lattobacilli sono presentati in tabella 1.

Tabella 1. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici sulle concentrazioni batteriche fecali.

Table 1. Effect of dietary addition with three antibiotics on the bacteria counts in feces and jejunum content of weaning pigs.

	Dieta					Significatività, p		
	C	**A**	**D**	**T**	**ESM**	**C vs. (A+D+T)**	**T vs. (A+D)**	**A vs. D**
Enterobacteriaceae (Log10 UFC/g/feci)								
d 0	7.13	6.92	7.51	7.24	0.25	0.749	0.933	0.089
d 7	5.85	6.43	5.36	3.55	0.23	0.006	<0.001	0.001
d 14	5.33	6.40	4.79	1.98	0.23	0.001	<0.001	<0.001
d 21	4.96	5.74	4.30	1.78	0.23	<0.001	<0.001	<0.001
lattobacilli (Log10 CFU/g feci)								
d 0	7.96	7.79	7.63	7.89	0.18	0.355	0.414	0.527
d 7	8.56	8.17	8.69	8.78	0.15	0.947	0.066	0.016
d 14	8.64	8.08	8.70	8.55	0.15	0.258	0.374	0.003
d 21	8.48	7.78	8.45	8.50	0.15	0.161	0.051	0.003

A partire dalla prima settimana si è registrata una diminuzione significativa fra i gruppi trattati e il gruppo di controllo per il parametro concentrazione di enterobatteri nelle feci. Osservando i dati ottenuti nei diversi gruppi di trattamento si osserva che questo effetto è associato esclusivamente alla dieta integrata con tilmicosina. Infatti a partire già dalla prima settimana il gruppo trattato con la dieta T ha fatto registrare una drastica riduzione del parametro in questione rispetto agli altri trattamenti. Al giorno 21 la differenza fra T e gli altri gruppi varia fra i 3 ed i 4 logaritmi. Per quanto riguarda la concentrazione dei lattobacilli, complessivamente l'effetto dei 3 antibiotici nei confronti del gruppo di controllo non appare significativo. Si evidenzia un effetto negativo sul parametro da parte della dieta A (amoxicillina) che assume carattere di significatività statistica nei confronti del gruppo D ed estendibile per analogia ai gruppi C e T.
In tabella 2 sono rappresentati i risultati dei parametri IPG, AI e ICA. Nei gruppi trattati con antibiotico si registra un aumento del 34,7% dell'IPG ($p < 0.01$) nella prima settimana e del 9% ($p < 0.05$) durante le tre settimane complessive di trattamento. Durante l'ultima settimana quando tutti i suini hanno ricevuto la stessa dieta, non sono state registrate differenze significative nella crescita.
Anche l'assunzione di alimento è risultata maggiore nei gruppi trattati. Tale aumento è stato del 19% ($p<0.01$) e del 8,3% ($p<0,05$) rispettivamente nella prima settimana e nelle tre settimane di trattamento. In confronto alla dieta di controllo, la supplementazione antibiotica non ha influito sulla conversione dell'alimento (ICA).
L'effetto della supplementazione con i tre antibiotici sul peso del piccolo intestino a vuoto e del contenuto dello stesso piccolo intestino sono illustrati in tabella 3.
Complessivamente i tre antibiotici non hanno influito su questi tre parametri in confronto alla dieta di controllo. Tuttavia i soggetti alimentati con tilmicosina hanno mostrato un trend ad avere un contenuto intestinale inferiore rispetto a quelli alimentati con le diete A e D, sia a termine del trattamento sia dopo la settimana di sospensione ($p = 0.070$ and $p = 0.140$). Se i dati relativi a questi due end point vengono aggregati, la differenza assume valore di significatività statistica ($p < 0.05$).
In tabella 4 sono riportati i dati relativi alla quantificazione delle IgM e delle IgA nel sangue periferico. Alla fine delle tre settimane di trattamento è stato possibile osservare una diminuzione statisticamente significativa ($p<0,05$) della concentrazione di IgM nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo.

Tabella 2. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici su alcuni parametri produttivi

Table 2. Effect of dietary addition with three antibiotics on growth performance of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs. (A+D+T)	T vs. (A+D)	A vs. D
Peso vivo, kg								
d 0	6.65	6.65	6.65	6.68	0.22	0.953	0.908	0.997
d 21	13.15	13.63	13.92	13.70	0.41	0.200	0.873	0.602
d 28	16.86	16.95	18.18	17.55	0.91	0.516	0.986	0.356
ADG, g								
d 0 to 7	120	156	157	169	13	< 0.01	0.436	0.950
d 7 to 14	350	347	364	358	17	0.767	0.922	0.461
d 14 to 21	459	494	518	475	21	0.133	0.242	0.417
d 0 to 21	310	332	346	334	12	< 0.05	0.722	0.406
d 21 to 28	500	500	581	532	42	0.448	0.864	0.192
Ass. aliment, g								
d 0 to 7	217	251	261	261	12	< 0.01	0.749	0.588
d 7 to 14	453	468	453	474	20	0.596	0.564	0.597
d 14 to 21	629	652	716	684	26	0.596	0.564	0.597
d 0 to 21	433	457	477	473	15	< 0.05	0.740	0.363
d 21 to 28	790	814	927	865	67	0.330	0.946	0.252
ICA								
d 0 to 7	1.92	2.12	1.90	1.72	0.24	0.968	0.332	0.510
d 7 to 14	1.34	1.38	1.27	1.37	0.05	0.937	0.501	0.108
d 14 to 21	1.37	1.33	1.40	1.44	0.03	0.591	0.061	0.087
d 0 to 21	1.42	1.39	1.38	1.43	0.03	0.598	0.150	0.976
d 21 to 28	1.59	1.63	1.61	1.63	0.06	0.592	0.939	0.813

Tabella 3. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici su peso a vuoto relativo del piccolo intestino e del contenuto del piccolo intestino

Table 3. Effect of dietary addition with three antibiotics on the relative weight of the empty small intestine and of small intestine content of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs. (A+D+T)	T vs. (A+D)	A vs. D
Peso a vuoto piccolo intestino, % PV								
21 d	3.58	3.52	3.37	3.56	0.15	0.551	0.527	0.475
28 d	3.32	3.30	3.28	3.45	0.20	0.941	0.528	0.929
Peso contenuto piccolo intestine, % PV								
21 d	2.26	2.45	2.04	1.79	0.19	0.459	0.070	0.141
28 d	1.88	2.12	1.96	1.65	0.20	0.919	0.140	0.578

Tabella 4. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici sulla concentrazione sierica di IgA e IgM

Table 4. Effect of dietary addition with three antibiotics on IgA and IgM total contents in blood serum of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs. (A+D+T)	T vs. (A+D)	A vs. D
IgA (µg/mL)								
21 d1	504	490	589	469	43	0.796	0.184	0.100
28 d	623	510	747	501	135	0.826	0.441	0.221
IgM (µg/mL)								
21 d1	2577	1993	2327	1896	180	0.016	0.237	0.187
28 d	2277	1770	1591	1557	280	0.084	0.716	0.648

[1] Su tutti i suini in prova.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati fin qui ottenuti consentono di estrapolare alcune importanti considerazioni. In primo luogo i dati ottenuti confermano quanto già suggerito da Collier e collaboratori (2003) in relazione al diverso effetto che classi diverse di antibiotico possono avere sulla microflora intestinale del suinetto in svezzamento. In quel lavoro, in particolare, era stato evidenziato come a fronte di una riduzione complessiva della carica microbica ileale, i soggetti alimentati con un mangime supplementato con tilosina, avessero fatto registrare a fine prova concentrazioni di lattobacilli più elevate rispetto al gruppo alimentato con una dieta supplementata con altri antibiotici a rotazione. Nella nostra esperienza, tilmicosina, una molecola appartenente alla classe dei macrolidi come tilosina, ha avuto sostanzialmente un comportamento analogo spostando decisamente a favore dei lattobacilli e a danno degli enterobatteri l'equilibrio della flora enterica. Secondo i numerosi studi citati nella parte introduttiva, questa situazione è potenzialmente molto favorevole nel contrastare la colonizzazione e l'azione di batteri patogeni per l'intestino. Considerato il fatto che la presenza concomitante di problematiche enteriche e respiratorie nella fase di svezzamento è evenienza tutt'altro che rara, ciò potrebbe essere tenuta in considerazione nella scelta dell'antibiotico da includere nel mangime. Il tipo di analisi fin ora eseguito sulla flora intestinale non consente tuttavia di valutare quali specie batteriche siano state in particolare favorite o abbattute dai diversi trattamenti né tanto meno di stimare l'effetto sulla variabilità genetica della flora commensale. Se queste indicazioni saranno rese possibili dagli approfondimenti biomolecolari in corso (DGGE), sarà possibile formulare delle ipotesi sui meccanismi attraverso i quali i tre diversi antibiotici hanno influenzato la flora intestinale.

Per quanto riguarda l'effetto degli antibiotici sulle performance zootecniche, esso è stato favorevole in particolare nella prima settimana di somministrazione, risultando comunque apprezzabile per tutto il periodo di trattamento. Le tre diete supplementate hanno fatto registrare un aumento degli incrementi ponderali, legato direttamente ad una maggiore assunzione di alimento. L'indice di conversione dell'alimento non è risultato influenzato.

L'effetto migliorativo degli antibiotici sulle performance produttive è noto da tempo, tanto che fino a pochi anni fa il loro utilizzo come *growth promoters* era assai diffuso. Per spiegare come la somministrazione di antibiotici a dosaggi subterapeutici migliori l'efficienza produttiva del suinetto sono stati ipotizzati 4 diversi possibili meccanismi (Gaskins et al, 2002, Dibner e Richards, 2005, Page, 2006): 1) inibizione delle infezioni subcliniche con conseguente riduzione dei costi metabolici del sistema immunitario, 2) riduzione di metaboliti microbici che deprimono la crescita, 3) riduzione dell'utilizzo dei nutrienti da parte dei batteri, 4) miglioramento dell'assunzione dei nutrienti per minore spessore della parete intestinale negli animali trattati. Più recentemente è stato proposto un quinto meccanismo che indicherebbe nell'effetto antinfiammatorio non antibiotico le motivazioni del miglioramento delle performance produttive (Niewold, 2007). In questa prova gli antibiotici non sono stati somministrati come *growth promoters* ma a dosaggio terapeutico. Il fatto che il miglioramento dei parametri zootecnici sia stato legato ad un aumento dell'ingestione piuttosto che ad una diminuzione dell'ICA, mal si concilia con le ipotesi suddette. E' ipotizzabile invece che gli antibiotici abbiano migliorato a livello sistemico e/o intestinale le condizioni di salute degli animali, stimolando l'assunzione di alimento. La diminuzione delle IgM circolanti nei gruppi trattati può essere considerata a supporto di questa ipotesi, indicando una possibile diminuzione della attivazione della risposta immunitaria verso infezioni di tipo subclinico. E' stato infatti dimostrato che gli antibiotici sono in grado di diminuire la produzione di citochine pro-infiammatorie che sono responsabili anche di una diminuzione dell'appetito (Gruys et al, 2006). E' possibile inoltre che i tre antibiotici abbiano orientato la microflora intestinale verso un profilo che favorisce la sviluppo della tolleranza immunitaria (Bailey, 2009), a prescindere dalle variazioni di conteggio dei tipi batterici considerati. In conclusione si ritiene che la scelta dell'antibiotico da utilizzare in una fase delicata come il periodo di svezzamento del suino, debba tenere in considerazione anche gli effetti che esso può determinare sull'equilibrio della microflora intestinale, che è diverso a seconda della molecola utilizzata. Ulteriori indicazioni potranno essere fornite dallo sviluppo di questo lavoro, in particolare quando saranno disponibili gli accertamenti biomolecolari che potranno fornirci un quadro più dettagliato dell'effetto dei diversi trattamenti sulla variabilità genetica della microflora e su singole specie batteriche con effetto probiotico (*Lactobacillus* spp) o patogeno (*Escherichia coli, Salmonella*).

Table. Effect of dietary addition with three antibiotics on IgA and IgM total contents in blood serum of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs. (A+D+T)	T vs. (A+D)	A vs. D
IgA (µg/mL)								
21 d1	504	490	589	469	43	0.796	0.184	0.100
28 d	623	510	747	501	135	0.826	0.441	0.221
IgM (µg/mL)								
21 d1	2577	1993	2327	1896	180	0.016	0.237	0.187
28 d	2277	1770	1591	1557	280	0.084	0.716	0.648

[1]On all pigs in trial.

References

Anderson R. C., Genovese K. J., Harvey R. B., Stanker L. H., Keith N.k., Deloak J.R., Nisbet D.J., 1999. Effect of competitive esclusion on transmission of Salmonella choleraesuis between early weaned pigs. Proceedidimgs of the 3th International Symposium on the epidemiology and control of Salmonella in pork , Washington., USA, p.p. 18-21.

Bailey M., 2009. The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig. Dev Comp Immunol. 33, 75-83.

Bosi P., Sarli P., Casini L., De Filippi S., Trevisi P., Mazzoni M., Merialdi G., 2007. The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in Escherichia coli K88-challenged weanling pigs,. Anim. Feed Sci. Technol. 139, 170-185.

Canibe N. e Jansen B. B., 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. J. Anim. Sci. 81, 2019-2031

Canibe N., Højberg O., Højsgaard S. e Jensen B. B., 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. J. Anim. Sci. 83, 1287-1302

Collier, C.T., M.R. Smiricky-Tjardes, D.M. Albin, J.E. Wubben, V.M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D.B. Anderson, and H.R. Gaskins. 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. J. Anim. Sci. 81:3035-3045.

Dibner JJ, Richards JD, 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult Sci., 84(4):634-43.
Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB, 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action Anim Biotechnol., 13(1):29-42.

Gruys E.M.J., Toussaint J.M., Niewold T.A.., Koopmams, S.J., van Dijk E., Meloen R.H., 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. Acta Histochem., 108:229-232
Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, Akkermans AD, Smidt H, de Vos WM. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. Environ. Microbiol. 8:1191-1199.

Mikkelsen L. L., Naughton P. J., Hedemann M. S. e Jensen B. B., 2004. Effects of Physical properties of feed on microbial ecology and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 70.6, 3485-3492

Niewold TA., 2007. The non antibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poult Sci. 86(4):605-9

Øverland M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M., 2000 "Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs". J. Anim. Sci. 78, 1875-1884.

Page, S. W., 2006. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits. Pag 19-51 in Antimicrobial Growth Ptomoters:whre do we go from here? D. Barug, J. de Jomg, A.K. Kies, Verstegen M., Editore Wageningen Academic Publisher, Wageningen, Olanda.
Russell JB, Diez-Gonzalez F., 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. Adv Microb Physiol.;39:205-34.

Spencer RJ, Chesson A., 1994. The effect of Lactobacillus spp. on the attachment of enterotoxigenic Escherichia coli to isolated porcine enterocytes. J Appl Bacteriol.;77(2):215-20.

van Winsen R. L., Keuzenkamp D., Urlings B. A. P., Lipman L. J. A., Snijders J. A. M., Verheijden J. H. M. e van Knapen F., 2002. Effect of fermented feed on shedding of Enterobacteriaceae by fattening pigs. Short communication. Vet. Microbiol. 87, 267-276

van Winsen R. L., Urlings B. A. P, Lipman L.J.A., Snijders J.M.A., Keuzenkamp D., Verheijden J.H.M. e van Knapen F., 2001. Effect of fermented feed on microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. Appl. Environ. Microbiol. 67.7, 3071-3076

IL VIRUS INFLUENZALE SUINO (*SIV*) E LE PRINCIPALI ASSOCIAZIONI VIRALI, BATTERICHE E DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN 150 EPISODI DI PATOLOGIA RESPIRATORIA NEL SUINO

M. GRADASSI, E. SOZZI, M. ZANONI, C. SALOGNI, P. CORDIOLI, L. ALBORALI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Suino; Influenza; PRDC

Key words: Pig; Influenza; PRDC

Riassunto. Il virus dell'influenza suina (*SIV*) è causa frequente, nella specie, di patologia respiratoria acuta oltre ad essere un importante patogeno che concorre all'eziologia del complesso respiratorio del suino (PRDC). Tale studio retrospettivo ha come obiettivi principali sia quello di indagare la prevalenza di infezione da diversi sottotipi di *SIVs* in allevamenti del Nord Italia, a partire dai campioni conferiti ai Laboratori Veterinari della Sezione Diagnostica di Brescia, sia di valutare la prevalenza di diversi patogeni in associazione a *SIV* in episodi di patologia respiratoria. *SIV* è un agente in grado di determinare da solo un quadro di patologia respiratoria, e tale sua abilità è di considerevole valenza nella eventuale evoluzione del PRDC. La presenza dell'antigene di influenza virus tipo A, determinata attraverso l'ausilio di una RT-PCR, insieme con i segni clinici e-o le lesioni anatomo-patologiche indicativi di patologia respiratoria sono i criteri utilizzati per includere un episodio clinico nella presente indagine. Sono 150 i casi che hanno soddisfatto tali criteri nel periodo di studio. Il virus della PRRS è stato identificato nel 65,3% dei casi, il PCV-2 nel 34%, *Mycoplasma hyopneumoniae* nel 9,3% e gli agenti di pneumopatia batterica o setticemia nel 58,7%.

Abstract. The swine influenza virus (SIV) frequently causes acute respiratory disease in pigs worldwide and is an important pathogen in the porcine respiratory disease complex (PRDC). The purposes of this retrospective survey were to investigate the virologic prevalence of infection with SIV subtypes in North Italy farms, using samples submitted for a diagnosis to the Brescia Veterinary Diagnostic Laboratory, and to examine the prevalence of different pathogens detected in combination with *SIV* in field cases of respiratory diseases. The influenza virus is a respiratory pathogen able to cause disease by itself and its own ability is of great importance in the evolution of PRDC. The presence of Influenza Virus type A antigen, demonstrated by RT-PCR, together with clinical signs and/or pathological lesions of respiratory disease were taken as criteria to include a case in this survey. A total of 150 cases fulfilled these criteria during the study's period. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus was detected in 65,3% of the cases, PCV-2 in 34%, *Mycoplasma hyopneumoniae* in 9,3% and bacterial pneumonia or septicaemia in 58,7%.

INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza suina (*SIV*) è endemico nella popolazione suina mondiale e rappresenta, in tale specie, una causa frequente e primaria di patologia respiratoria. Le infezioni da SIV si manifestano comunemente sotto forma di focolai caratterizzati da un quadro respiratorio acuto, a rapida insorgenza ed evoluzione, e da sintomi clinici quali febbre, anoressia, perdita di peso, letargia, scolo nasale ed oculare, tosse e dispnea. L'influenza suina può sfociare in importanti perdite economiche che non si misurano in relazione al tasso di mortalità, generalmente inferiore all' 1%, ma piuttosto in base alla perdita di produttività in termini di riduzione dell'incremento ponderale, perdita di peso e costo dei trattamenti sostenuti.
I virus influenzali di tipo A, membri della famiglia *Orthomyxoviridae*, sono elementi virali pleomorfi a RNA a singola catena, dotati di envelope, distinti in sottotipi virali in base alle caratteristiche antigeniche delle glicoproteine esterne emoagglutinine (H1-H16) e neuroaminidasi (N1-N9). Attualmente sono endemici nella popolazione suina in Europa i tre sottotipi virali H1N1 (classico ed "*avian like*"), H3N2 (c.d. "*human like*") ed H1N2 ("*human avian reassortant*").
La natura dei virus influenzali del suino differisce nelle diverse regioni geografiche ed è in continua evoluzione; questo ha importanti riflessi sulla diagnosi e sul controllo dell'infezione, che non possono quindi prescindere da una continua sorveglianza epidemiologica; è essenziale infatti l'impiego di ceppi specifici quali antigeni per la messa a punto e di vaccini e di strumenti diagnostici (Van Reeth, 2007).
E' noto che il *SIV*, indipendentemente dal sottotipo coinvolto, ha un ruolo attivo e primario nell'evoluzione della patologia respiratoria: è infatti in grado da solo, quale unico agente causale, di determinare una forma clinicamente manifesta. Tale virus è capace di replicare attivamente all'interno delle cellule epiteliali dell'intero tratto respiratorio, quindi a livello della mucosa nasale, delle amigdale, della trachea e dei polmoni. Proprio per tale abilità può essere considerato un "*door-opener*" per altre infezioni respiratorie batteriche e virali tipiche del suino e si inserisce bene nell'evoluzione di una sindrome respiratoria multifattoriale cronica quale la PRDC (*Porcine Respiratory Disease Complex*). Tale sindrome è manifestazione clinica dell'azione integrata di vari agenti eziologici (*SIV, PRRSV, PCV2, Mycoplasma hyopneumoniae, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae, Streptococcus suis ed Haemophilus parasuis i principali*), oltre ad essere la conseguenza di condizioni ambientali e di strategie manageriali non idonee. La PRDC è quindi spesso sostenuta dall'azione contemporanea e sinergica di agenti sia virali che batterici e si esprime attraverso quadri clinici ed anatomo-patologici complessi e variegati, di difficile diagnosi e risoluzione, con tendenza alla cronicizzazione. Scopo di questo studio retrospettivo è di conoscere l'attuale circolazione dei diversi stipiti di virus influenzale negli allevamenti del Nord Italia; altro obiettivo prefissato, limitatamente ai casi confermati di influenza, è l'esame della prevalenza delle associazioni e delle combinazioni batteriche e virali che possono concorrere insieme con il *SIV* al verificarsi di episodi di *PRDC* nel nostro Paese.

MATERIALI E METODI

Finestra di studio

Il periodo di osservazione si sviluppa tra il Gennaio 2006 e il Settembre 2008; nel corso di questi 33 mesi, presso la Sede centrale di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sono stati accettati 2253 campioni, in prevalenza carcasse, polmoni e tamponi nasali, con anamnesi di patologia respiratoria.

Influenza viruses

Tutti i campioni sono stati sottoposti a *screening* tramite tecnica *Real Time* RT-PCR genematrice per la ricerca del genoma virale di influenza virus tipo A (*Spackman et al., 2002*). A partire dalle matrici risultate positive a tale esame (182/2253; 8,1%) si è proceduto all'isolamento virale con le metodiche finalizzate, che prevedono l'inoculazione del campione in:

- coltura cellulare su monostrato di cellule MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*);
- cavità allantoidea di almeno 5 uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni di età.

In seguito il liquido allantoideo ed il surnatante delle cellule sono stati analizzati con:

- test di emoagglutinazione (HA) per valutare l'attività emoagglutinante del virus;
- metodica immuno-enzimatica ELISA sandwich con Mab anti-NPA.

Da ultimo, è stata portata avanti la determinazione del sottotipo virale isolato per mezzo delle prove di inibizione dell' emoagglutinazione (HI) e di inibizione della neuroaminidasi (NI); quando necessario, il ceppo virale è stato sottotipizzato con l'ausilio di 4 RT-PCR che utilizzano *8 primers* specifici per amplificare le porzioni dei geni codificanti per H1, H3, N1 e N2 (Chiapponi *et al.*, 2003).

PRDC

Il nostro intento di effettuare l'analisi delle associazioni batteriche e virali ci ha portato a selezionare quali campioni di studio l'insieme dei casi che soddisfino i seguenti requisiti: sintomi clinici e/o lesioni anatomo-patologiche indicativi di problemi respiratori; positività dei campioni alla RT-PCR per Influenza virus tipo A.
La presenza di *PRRSV, PCV2* e *Mycoplasma Hyopneumoniae* è stata dimostrata tramite l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare: per *Mycoplasma Hyopneumoniae* si è utilizzata una PCR messa a punto a partire dal protocollo descritto da Stakenborg *et al.*, 2006, la quale utilizza una copia di *primer* selezionata in una regione specie-specifica; per PRRSV una reazione *One-Step* RT-PCR *multiplex* con *primers* specifici, descritti da Persia *et al.*, 2001, che permettono di differenziare il genotipo europeo dal genotipo americano; per PCV-2 la metodica PCR, descritta da Larochelle *et al.*, 1999, che amplifica un frammento di DNA di 263 bp.
L'isolamento e l'identificazione di ceppi batterici responsabili di setticemia e-o polmonite batterica è stato possibili per mezzo delle procedure di *routine* di coltura batterica e tipizzazione attualmente in uso presso la Sezione Diagnostica di Brescia.

RISULTATI

Influenza viruses

Le analisi RT-PCR per Influenza virus tipo A delle diverse matrici, quali carcasse, visceri e tamponi nasali, hanno identificato 182 campioni positivi; la distinzione di questi in base alla categoria produttiva di appartenenza, in Tab. 1, mostra che le positività si concentrano in particolare nella fase di svezzamento, che raccoglie il 54,4 % dei campioni totali positivi.

Categoria produttiva	N° campioni SIV +	SIV + (%)
Svezzamento	99	54,4
Magronaggio	46	25,3
Ingrasso	13	7,1
Sottoscrofa	13	7,1
Scrofetta	1	0,5
Non noto	10	5,5
TOTALE	182	100

Tabella 1: ***Distribuzione dei campioni SIV + in funzione della categoria produttiva di appartenenza.***

Tali campioni provengono da un totale di 131 allevamenti suini (Tab. 2), per la maggior parte da riproduzione (36,6 + 16 = 52,6% delle aziende), con netta prevalenza del sistema a ciclo aperto (36,6%) rispetto al ciclo chiuso (16%):

Tipologia Aziendale	N° Allevamenti SIV +	SIV + (%)
Riproduzione_ciclo_aperto	48	36,6
Ingrasso_finissaggio	30	22,9
Riproduzione_ciclo_chiuso	21	16
Ingrasso_svezzamento	8	6,1
Ingrasso_magronaggio	2	1,5
Non noto	22	16,8
TOTALE	131	100

Tabella 2: ***Numero di allevamenti e tipologie aziendali SIV +.***

A partire dalle positività in PCR si è giunti alla sottotipizzazione di 81 ceppi virali circolanti in 68 aziende del territorio; in particolare (Tab. 3) H1N1 è stato isolato in 28 aziende (41,2%), H3N2 in 22 aziende (32,4%) ed H1N2 in 7 aziende (10,3%). E' possibile la circolazione di più ceppi virali all'interno della stessa unità produttiva: l'associazione H1N1-H3N2, dimostrata in 6 aziende (8,8%), risulta la più rappresentata:

Sottotipo virale	N° Aziende SIV +	SIV + (%)
H1N1	28	41,2
H3N2	22	32,4
H1N2	7	10,3
H3	1	1,5
N1	1	1,5
H1N1 + H1N2	2	2,9
H1N1 + H3N2	6	8,8
H1N2 + H3N2	1	1,5
TOTALE	68	100

Tabella 3: ***risultati della sottotipizzazione dei virus influenzali isolati.***

Visualizziamo di seguito, in Fig. 1, la distribuzione geografica delle diverse aziende del territorio con dimostrata circolazione di ceppi influenzali e di associazioni virali:

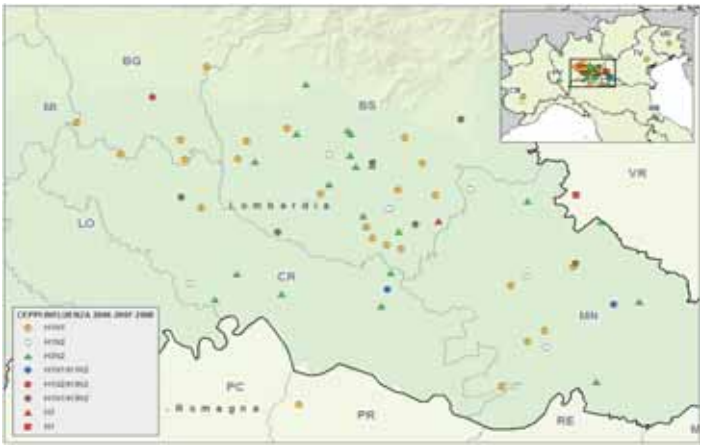


Figura 1: ***distribuzione geografica delle aziende suinicole con dimostrata circolazione dei sottotipi influenzali tipici del suino.***

PRDC

All'interno del periodo di indagine, 150 casi di patologia respiratoria soddisfacevano i requisiti stabiliti quali premesse allo studio. Di questi, 85 (56,6%) si presentavano con lesioni anatomopatologiche tipiche dell'influenza suina: tracheobronchite catarrale e/o focolai ben demarcati di consolidamento lobulare o lobare, di colore dal rosso-porpora al grigio, localizzati a livello dei lobi cranio ventrali dei polmoni (Quadro A). In sovrapposizione alle lesioni tipiche (nel 33,9% dei casi) o in sostituzione ad esse (nel 28,1% dei casi) si aggiungevano i seguenti quadri: pleuropolmonite o polisierosite (42,1%; Quadro D), forme interstiziali di polmonite (24,7%; Quadro B), congestione polmonare (11,4%; Quadro C). In 13 casi (8,7%) non erano state apprezzate lesioni macroscopiche rilevanti (Quadro E). In Tab. 4 sono riportati i quadri anatomo-patologici e le rispettive combinazioni:

Tabella 4: ***principali quadri anatomopatologici osservati negli episodi di patologia respiratoria.***

	Quadri tipici e complicati								
	A	A + D	A + B	A + B + D	A + C	A + C + D		A + B + C + D	
N° di Casi	34	25	11	11	2	1		1	
% Casi	22,7	16,7	7,3	7,3	1,3	0,7		0,7	
	Quadri non tipici								
	B	C	D	E	C + D	B + C	B + D	B + C + D	Non noto
N° di Casi	8	6	19	13	3	3	2	1	10
% Casi	5,3	4,0	12,7	8,7	2,0	2,0	1,3	0,7	6,7

Didascalia: Quadro A: tracheobronchite catarrale e-o epatizzazione rosso-grigia ai lobi apicali polmonari; Quadro B: polmonite interstiziale; Quadro C: congestione polmonare; Quadro D: pleuropolmonite o polisierosite; Quadro E: assenza di lesioni.

I dati presentati in Figura 2 mostrano la distribuzione dei casi sulla base delle diverse associazioni batteriche o virali intercorse. In 123 episodi (82%) il virus dell'influenza suina è associato ad altri agenti di patologia respiratoria. La copresenza di *SIV* + PRRSV + Batteri è la combinazione più comune con 32 casi (21,3%). Seguono in ordine decrescente di prevalenza altre coinfezioni: *SIV* + PRRSV + PCV-2 + Batteri (28 casi; 18,7%), *SIV* + PRRSV (17 casi; 11,3%), *SIV* + Batteri (14 casi; 9,3%), SIV + PRRSV + PCV-2 (9 casi; 6%), SIV + PCV-2 (7 casi; 4,7%), *SIV* + PRRSV + PCV-2 + *M. hyopneumoniae* + Batteri (4 casi; 2,7%), *SIV* + PRRSV + *M. hyopneumoniae* (2 casi; 1,3%), *SIV* + PCV-2 + Batteri (2 casi; 1,3%); *SIV* + *M. hyopneumoniae* + Batteri (1 caso; 0,7%) e *SIV* + PCV-2 + *M. hyopneumoniae* + Batteri (1 caso; 0,7%). Sono solo 27 (18%) gli episodi in cui è stata confermata una infezione da Influenza virus non associata ad altri agenti eziologici.

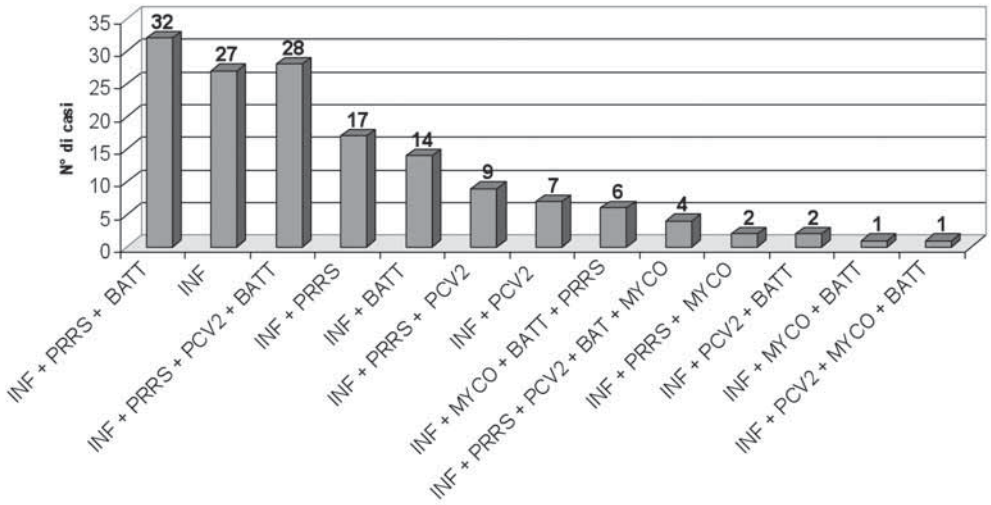


Figura 2: ***numero di casi di patologia respiratoria per le diverse combinazioni di patogeni associate a SIV.***

Quindi la prevalenza complessiva dell'associazione con *SIV* (Tab. 5) è del 65, 3% per PRRSV (98 casi), del 58,7% per agenti batterici (88 casi), del 34% per PCV-2 (51 casi), e del 9,3 % per M. hyopneumoniae (14 casi). Per quanto concerne l'associazione SIV + PRRSV, è bene specificare che in 94 casi (95,9%) è stato identificato il PRRSV ceppo europeo, in 2 casi il solo ceppo americano ed infine nei rimanenti 2 casi entrambi i ceppi, americano ed europeo.

Tabella 5: ***numero di casi in cui SIV si associa ad un altro agente patogeno, batterico o virale.***

	Associazioni batteriche e virali			
	SIV + PRRSV	SIV + BATTERI	SIV + PCV-2	SIV + *M. hyopneumoniae*
N° di Casi	98	88	51	14
% Casi	65,3	58,7	34	9,3

La coinfezione del virus influenzale con batteri primari e secondari di patologia respiratoria, presente nel 58,7% dei casi analizzati, viene illustrata in Figura 3:

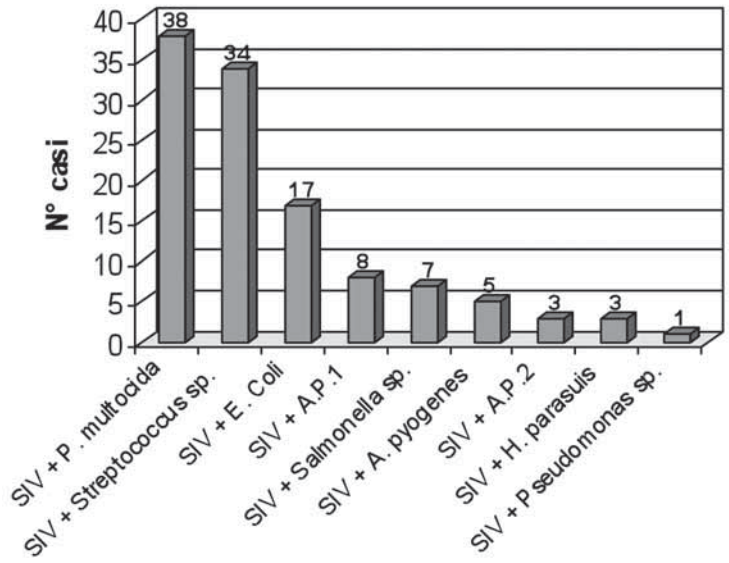


Figura 3: ***numero di casi con coinfezione SIV + agenti batterici.***

Complessivamente, la più alta prevalenza spetta all'associazione *SIV* + *Pasteurella multocida* (38 casi; 25,3%) alla quale seguono in ordine decrescente: Streptococcus sp., che è stato isolato in 34 casi (22,7%) e tipizzato in 19 nelle sierovarianti *Streptococcus suis sierotipo* 2 (8 casi), *Streptococcus dysgalactiae* (6 casi) e *Streptococcus pyogenes*

(5 casi) (Tab. 6); *E. Coli* (17 casi; 11,3%) (Tab. 6); Actinobacillus pleuropneumoniae biotipo 1 (8 casi; 5,3%); *Salmonella sp.* (7 casi; 4,7%) nelle s*erovars choleraesuis (3), typhimurium* (2), *thompson* (1) e *livingstone* (1) (Tab. 6); *Actinomyces pyogenes* (5 casi; 3,3%); *Actinobacillus pleuropneumoniae biotipo 2 e Haemophilus parasuis* (3 casi; 2%); *Pseudomonas sp* (1 caso; 0,7%).

Tabella 6: ***risultati delle tipizzazioni degli isolati batterici del Gen. Streptococcus, Salmonella ed Escherichia.***

Gen. Streptococcus	**N° isolati**
Streptococcus suis sierotipo 2	8
Streptococcus dysgalactiae	6
Streptococcus pyogenes	5
Streptococcus sp.	15
Gen. Salmonella	**N° isolati**
Salmonella choleraesuis	3
Salmonella typhimurium	2
Salmonella thompson	1
Salmonella livingstone	1
Gen. Escherichia	**N° isolati**
Escherichia Coli	14
Escherichia Coli emolitico	3

Nell'evoluzione dello stesso episodio respiratorio, si è dimostrata frequente la sovrapposizione a *SIV* di 2 e talvolta 3 agenti batterici (Fig. 4): *SIV* + *Pasteurella multocida* + *Streptococcus sp*. (7 casi; 8%) è la predominante.

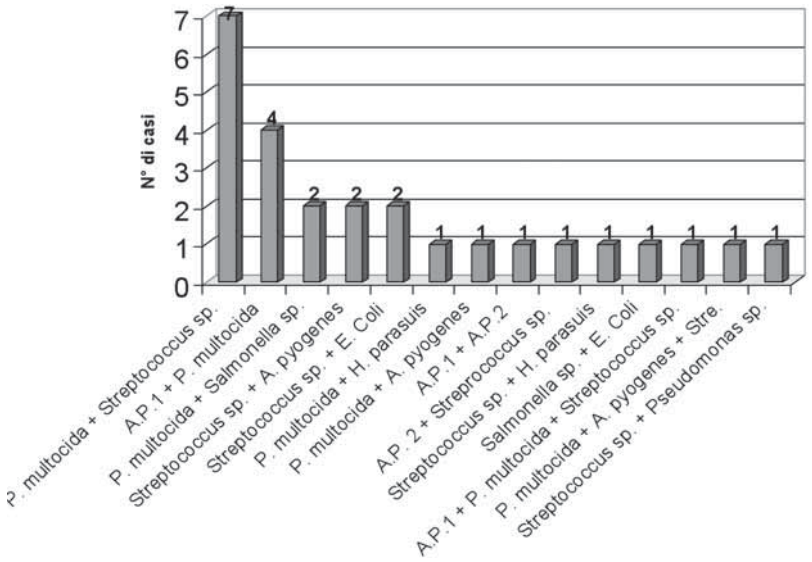


Figura 4: ***numero di casi in cui SIV si associa a 2 o 3 agenti batterici***

DISCUSSIONE

Influenza viruses

I dati presentati, in sintonia con precedenti indagini virologiche (Luppi *et al.*, 2007; Barigazzi e Donatelli, 2003), confermano l'attuale presenza negli allevamenti del Nord Italia dei tre sottotipi virali H1N1, H3N2 e H1N2, in ordine di prevalenza. L'infezione da influenza virus interessa prevalentemente la categoria produttiva dello svezzamento (54,4%) ed il sistema di allevamento da riproduzione a ciclo aperto (36,6%). Tale tipologia aziendale risulta epidemiologicamente più a rischio in quanto *SIV* può fare il suo ingresso in allevamento attraverso l'introduzione di capi infetti; la stessa rappresenta poi, grazie alla continua disponibilità di giovani suini, suscettibili all'infezione, e di nuovi riproduttori, un ecosistema ideale alla circolazione ed al mantenimento di tale virus (Brown, 2000).

PRDC

La significativa presenza, pari all' 82%, di vari agenti patogeni nei casi esaminati di patologia respiratoria *SIV*-associata, avvalora l'ipotesi che il virus dell'influenza suina possa ricoprire un ruolo protagonista nell'evoluzione della sindrome PRDC. Lo studio del meccanismo patogenetico proprio di tale virus è utile a meglio comprendere i fenomeni di interazione e di sinergia che possono intercorrere fra *SIV* ed altri microrganismi; il *SIV* replica all'interno delle cellule dell'intero tratto respiratorio, prevalentemente a livello dell' epitelio bronchiale e bronchiolare, causando processi di degenerazione e necrosi delle cellule epiteliali. L'evoluzione successiva in una pneumopatia S*IV*-indotta è subordinata al realizzarsi di diverse condizioni, fra cui importante evento iniziale è l'infezione a carico della mucosa delle porzioni distali delle vie respiratorie (Jung *et al.*, 2002), cui faccia seguito una massiva replicazione del *SIV* a livello del parenchima polmonare. L'entità di tale fase replicativa sembra determinante poiché regola la capacità chemiotattica e la conseguente liberazione di mediatori dell'infiammazione quali IFN-α, TNF-α, IL-1 ed IL-6: sono tali citochine infatti le principali responsabili dei danni a carico del parenchima polmonare (Van Reeth, 2007). Alcuni autori suggeriscono poi che il *SIV* possa infettare e distruggere i macrofagi polmonari e di conseguenza portare ad una riduzione della *clearance polmonare* (Jung *et al.*, 2002).
L'azione patogena *SIV*-associata a carico delle prime vie respiratorie può tradursi in una spiccata disponibilità dei soggetti colpiti all'ingresso di nuovi agenti patogeni; dunque, l'influenza suina in combinazione con altri agenti e attraverso un processo di addizione, complementarietà o sinergia dei meccanismi patogenetici coinvolti può dar luogo ad un quadro respiratorio più prolungato e ad un tasso di mortalità più alto rispetto a quanto normalmente si osserva in episodi respiratori non complicati.
A partire dai nostri dati, si ricava che il **PRRSV**, uno dei virus da sempre più comunemente coinvolti in episodi di PRDC, rappresenta l'agente eziologico che più di altri coesiste con il *SIV* (65,3% dei casi). Tale associazione, che comprende spesso anche complicazioni batteriche (21,3%), fornisce un esempio di complementarietà dei meccanismi patogenetici: se da un lato infatti il virus dell'influenza suina replica

prevalentemente a livello dell'epitelio bronchiale e bronchiolare, e solo in minor grado all'interno dei pneumociti e dei macrofagi alveolari (Vincent *et al.*, 1997), dall'altro il PRRSV seleziona proprio tali elementi cellulari quali siti di replicazione primaria portando alla sostituzione degli stessi con cellule immature del tutto incapaci di contenere eventuali infezioni batteriche. Di conseguenza l'azione integrata di tali virus apre con facilità la strada ad infezioni batteriche secondarie; viene a tale proposito confermata sperimentalmente da alcuni autori una maggiore suscettibilità di soggetti PRRS positivi alla colonizzazione polmonare da parte di *Streptococcus suis sierotipo 2* (Thanawongnuwech *et al.*, 2000); è interessante notare che nella nostra casistica ben 26 ceppi di *Streptococcus sp*., sui 34 totali, sono stati isolati da soggetti PRRSV e *SIV* positivi (dati non riportati). Anche in assenza di complicazioni batteriche, come dimostrato da Van Reeth et al., 1996, la coinfezione *SIV*-PRRSV può assumere un carattere di sinergia.

Meno rappresentato risulta il binomio *SIV* + **PCV-2**; questo infatti intercorre nel 34% dei casi, e spesso in concomitanza con il virus della PRRS e con agenti batterici. Dalla letteratura ci è noto che nell'evoluzione del complesso respiratorio l'azione del PCV-2 è spesso associata a *SIV*, PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Ellis *et al.*, 2004); in tali casi la presenza del PCV-2 si può considerare indipendente dalla diagnosi di PMWS e si manifesta con quadri di broncopolmonite interstiziale granulomatosa (Opriessnig *et al.*, 2007). Una infezione da influenza virus può rappresentare uno stimolo importante alla replicazione del PCV-2, poichè il ciclo replicativo di quest'ultimo è tipicamente subordinato al processo di divisione cellulare (Steiner *et al.*, 2008); tale processo mitotico viene infatti stimolato dall'azione di altri agenti di patologia respiratoria, come il *SIV*, in grado di causare la morte cellulare e di promuovere la successiva rigenerazione tessutale.

La nostra indagine solo nel 9,3 % dei casi ha registratato la contemporanea positività in PCR per Influenza virus e per **Mycoplasma hyopneumoniae**, nonostante il ruolo primario di quest'ultimo in episodi di PRDC e la condivisione con *SIV* degli stessi tessuti bersaglio: *Mycoplasma hyopneumoniae* infatti colonizza la superficie luminale delle cellule epiteliali bronchiali e bronchiolari, aderisce alle cilia dell'epitelio provocando ciliostasi, perdita delle cilia ed effetto citopatico (Kwon *et al.*, 2002; Young *et al.,* 2000). E' di particolare interesse, al fine di interpretare tale bassa prevalenza, quanto risulta da uno studio sperimentale condotto da Thacker *et al.*, 2001: tali autori evidenziano, in caso di coinfezione *SIV-M. hyopneumoniae*, la mancanza di quegli aspetti di interazione tipicamente osservati tra *Mycoplasma* ed altri virus, quali PRRSV e PCV-2; *Mycoplasma* ed il virus dell'influenza suina sembrano agire indipendentemente l'uno dall'altro, provocando lesioni relativamente transitorie e percorrendo la propria evoluzione patogenetica in assenza di un effetto di potenziamento reciproco.

L'infezione simultanea da influenza virus e **batteri**, spesso descritta in letteratura, viene ampiamente confermata dalla presente ricerca: *SIV* coincide con l'isolamento di agenti batterici, setticemici e non, nel 58,7 % degli episodi respiratori. Il virus dell'influenza infatti non solo facilita l'ingresso di tali microrganismi ma è in grado anche di potenziare l'abilità patogenetica di alcuni batteri, in particolare di *Pasteurella multocida* e di *Streptococcus suis sierotipo 2*. Tale rapporto sinergico assume poi carattere di reciprocità quando *SIV* si accompagna a microrganismi come *Streptococcus pyogenes* (Mancini *et al.*, 2005) e *Streptococcus suis tipo 2* (Wang e Lu., 2008),

batteri questi in grado di produrre proteasi extracellulari con un ruolo attivo nel clivaggio dell'emoagglutinina virale; ciò che porta ad un incremento della capacità infettante del virus influenzale. A ragione di quanto appena descritto e dell'alta prevalenza sia di *Pasteurella multocida* (25,3%) che di S*treptococcus sp*. (22,7%) riteniamo che il ruolo di tali agenti patogeni nell'evoluzione del complesso respiratorio del suino non debba essere sottostimato.
La co-infezione *SIV-Escherichia Coli* è stata osservata in 17 casi di patologia respiratoria (11,3%) nelle fasi di inizio svezzamento e sottoscrofa (dati non riportati): è infatti durante tale periodo produttivo che alcuni patotipi del batterio possono essere causa di setticemia primaria o secondaria, di polisierosite, di danni polmonari endotossine- e citotossine-dipendenti.
Sono risultate infine meno frequenti, in combinazione con *SIV,* altra forme setticemiche di polmonite batterica, nello specifico da *Salmonella sp.*, *Actinomyces pyogenes e Haemophilus parasuis*. Sporadici anche gli episodi di pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*: non sono attualmente note infatti associazioni batteriche o virali che predispongano ad APP (Serrano-Rubio *et al.*, 2008) o che abbiano effetto sull'evoluzione delle lesioni APP-indotte (Pol *et al.*, 2007; Van Reeth *et al.*, 1996).

CONCLUSIONI

Ad oggi sono pochi i lavori scientifici che indagano la prevalenza ed il ruolo di *SIV* in episodi di PRDC, dunque i casi di co-infezione ed i meccanismi di interazione con altri agenti patogeni. Data la natura endemica di *SIV* nella popolazione suina mondiale ed il ruolo primario dello stesso quale patogeno respiratorio, è auspicabile uno sforzo maggiore attraverso studi retrospettivi e prospettivi volti a meglio comprendere il peso che tale agente virale può assumere nell'evoluzione del complesso respiratorio del suino.

Bibliografia:

1. Barigazzi G., Donatelli I. (2003): *Swine influenza* in Italy. *Veterinary Research Communication*, **27**: 93-99.
2. Brown I.H. (2000): The epidemiology and evolution of *influenza viruses* in pigs. *Vet. Microbiology*, **74**: 29-46.
3. Chiapponi C., Fallacara F., Foni E. (2003): Subtyping of H1N1, H1N2 and H3N2 *swine influenza viruses* by two multiplex RT-PCR. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on emerging and re-emerging Pig Diseases*, Rome, Italy, p.257.
4. Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G.M. (2004): Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*, **98**: 159-163.
5. Jung T., Choi C., Chae C. (2002): Localization of *Swine Influenza Virus* in naturally infected Pigs. *Vet. Pathol.*, **39**: 10-16.
6. Kwon D., Choi C., Chae C. (2008) : Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet. Pathol.*, **39**: 584-587.
7. Larochelle R., Antaya M., Morin M., Magar R. (1999): Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods,* **80**: 69-75.
8. 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 neuroaminidasi di virus influenzali suini circolanti nel Nord Italia nel periodo 1998-2006. *Atti Sipas* , XXXIII, 231-242.
9. Mancini D.A.P., Mendonca R.M.Z; Dias A.L.F., Mendonca R.Z., Pinto J.R. (2005): Co-infection between *influenza virus* and flagellated bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **47**: 275-280.
10. 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. *J.Vet. Diagn. Invest.*, **19**: 591-615.
11. 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. In: *Proceedings of the X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Salsomaggiore-Parma, Italy, p. 440-441.
12. Pol J.M., Van Leengoed L.A., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G. (1997): Dual infections of PRRS/*influenza* or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.*, **55**: 259-264.
13. Serrano-Rubio Luis E., Tenorio-Gutièrrez V., Suarez-Guemes F., Reyes-Cortes R., Rodriguez-Mendiola M., Arias-Castro C., Godinez-Vargas D., de la Garza M., (2008): Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay. *Molecular and Cellular Probes*, **22**: 305-312.
14. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. (2002): Development of a real-time

reverse transcriptase PCR assay for type *A influenza virus* and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**: 3256-3260.
15. Stakenborg T., Vicca J., Butaye P., Imberechts H., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck F., Maes D. (2006): *A multiplex* PCR to identify porcine *mycoplasmas* present in broth cultures. *Veterinary Research Communications*, **30**: 239-247.
16. Steiner E., Balmelli C., Herrmann B., Summerfield A., McCullough K. (2008): Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, **378**: 311-322.
17. Thacker E.L., Thacker B.J., Janke B.H. (2001): Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *swine influenza virus*. J. Clin. Microbiol., **39**: 2525-2530.
18. Thanawongnuwech R., Brown G.B., Halbur P.G., Roth J.A., Royer R.L., Thacker B.J. (2000): Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis infection*. *Vet. Pathol.*, **37**:143-152.
19. Van Reeth K. (2007): Avian and *swine influenza viruses*: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.*, **38**: 243-260.
20. Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M. (1996): Dual infection of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by > porcine respiratory coronavirus or *swine influenza virus*: a clinical and virological study. *Veterinary Microbiology*. **48**: 325-335.
21. Vincent L., Janke B., Paul P., Halbur P. (1997): A monoclonal-antibody-based immunohistochimical method for the detection of *swine influenza virus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**: 191-195.
22. Wang K., Lu C. (2008): *Streptococcus suis type 2* culture supernatant enhances the infection ability of the *Swine Influenza virus* H3 subtype in MDCK cells. Berl. Munch. Tierartzi Wochenschr., **121**: 198-202.
23. Young T.F., Thacker E.L., Erickson B.Z., Ross R.F. (2000): A tissue culture system to study respiratory epithelial adherence of selected swine *mycoplasmas*. *Vet. Microbiol.*, **71**: 269-279.

ESTEVE veterinaria
Più vicino

Innovazione e Ricerca al servizio della sanità e produzione suina

Soddisfazioni per i professionisti

Benessere per gli animali

Rispetto per l'ambiente

ESTEVE veterinaria
ESTEVE S.p.A.
Via Ippolito Rosellini, 12 - 20124 Milano - Tel.: 02 699 64 201 - Fax: 02 699 64 250
estevespa@esteve.es - www.veterinariaesteve.it

STUDIO PRELIMINARE SULL'IMPORTANZA DEL METODO D'ESTRAZIONE DEL DNA PER LA TITOLAZIONE DI PCV2 CON REAL-TIME PCR

PRELIMINARY EVALUATION OF IMPORTANCE OF DNA EXTRACTION METHOD FOR PCV2 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR DATA

FACCINI S., ROSIGNOLI C., FRANZINIG., NIGRELLI A.D.

Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagma
Sezione Diagnostica di Mantova

Parole chiave: Real-Time PCR quantitativa, PCV2, estrazione DNA.

Key words: Quantitative Real-Time PCR, PCV2, DNA extraction.

Riassunto. L'applicazione di metodi di Real-Time PCR quantitativa è divenuta importante sia per lo studio di PCV2 che per la diagnosi di patologie ad esso correlate. L'estrazione di DNA da campioni clinici è sicuramente una fase pre-analitica d'importanza critica. Resa, ripetibilità, purezza, efficacia nella rimozione degli inibitori influiscono infatti sui risultati ottenibili con la Real-Time PCR quantitativa. Scopo del presente lavoro è una preliminare valutazione dell'effetto di sistemi d'estrazione diversi sull'analisi quantitativa di due delle principali tipologie di campioni clinici: sieri e linfonodi. Quest'ultimi in particolare risultano essere i più problematici soprattutto in rapporto alla presenza d'inibitori negli estratti.

Abstract. Quantitative Real-Time PCR has become an important tool for PCV2 research and clinical diagnosis. DNA extraction from clinical samples is unquestionably a very critical pre-analytical step. Yield, repeatability, purity, and removal of PCR inhibitors undoubtedly affect quantitative Real-Time PCR results and performances. This study is a first evaluation of how extraction method influences PCV2 quantification in two of the most important clinical samples: serum and lymph node. The latter results to need particular attention due to frequent presence of PCR inhibitors in DNA extracts.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino di tipo 2 (PCV2) appartiene alla famiglia *Circoviridae*. E' un virus a DNA, privo di envelope, con genoma circolare a singolo filamento, di piccole dimensioni (1,8 Kb). PCV2 è stato riconosciuto come l'agente eziologico della sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS) che causa danni economici significativi alla produzione suina a livello mondiale. L'infezione da PCV2 è stata messa in relazione anche con diverse altre sindromi del suino collettivamente denominate "malattie associate a circovirus suino" (PCVAD). Molti studi basati sulla rilevazione del nucleocapside o del DNA virale hanno dimostrato che la quantità di virus presente nel siero e nei tessuti linfoidi degli animali con sintomi clinici è maggiore rispetto a quella riscontrabile nei soggetti sani o asintomatici,

suggerendo l'esistenza di una correlazione tra carica virale e sviluppo della malattia (Liu et al., 2000; Ladekjær-Mikkelsen et al., 2002; Rovira et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al, 2004; Chung et al, 2005). L'applicazione di metodi di Real-Time PCR quantitativa è divenuta importante sia per lo studio di PCV2 che per la diagnosi di patologie ad esso correlate. L'estrazione di DNA da campioni clinici è sicuramente una fase pre-analitica d'importanza critica (Niesters 2001;Espy et al., 2006; Gunson et al., 2006). Resa, ripetibilità, purezza, efficacia nella rimozione degli inibitori influiscono infatti sui risultati ottenibili con la Real-Time PCR quantitativa. Scopo del presente lavoro è una preliminare valutazione dell'effetto di sistemi d'estrazione diversi sull'analisi quantitativa di PCV2 in due delle principali tipologie campioni clinici: sieri e linfonodi.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati campioni di linfonodi e sieri precedentemente testati per PCV2 con Real-Time PCR e conservati a –80°C.
Il DNA virale è stato estratto dai campioni di siero in doppio e in parallelo con almeno due delle seguenti metodiche. Metodo sera A: 200µl di siero sono stati processati con Trizol LS® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione dell'RNA. E' noto infatti che, probabilmente a causa del suo genoma a singolo filamento e le sue dimensioni ridotte, il genoma di PCV2 viene facilmente purificato insieme all'RNA. Nel passaggio finale il DNA è stato risospeso in 30µl di acqua di grado per PCR. Metodo sera B: 200µl di siero sono stati processati con Nucleospin Blood (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG Düren, Germany), seguendo il protocollo indicato dal produttore. L'eluizione è stata ottenuta con 100µl di acqua di grado per PCR scaldata a 70°C. Metodo sera C: 200µl di siero sono stati processati con High Pure Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) come raccomandato dal produttore. L'eluizione è stata ottenuta con 50µl di acqua di grado per PCR. Dai campioni di linfonodi è stato ottenuto un omogenato al 20% in soluzione fisiologica. Il DNA virale è poi stato purificato in doppio e in parallelo secondo almeno due delle seguenti metodiche. Metodo tissues A: 200µl di omogenato sono stati processati con Trizol LS® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione dell'RNA. Nel passaggio finale il DNA è stato risospeso in 60µl di acqua di grado per PCR. Metodo tissues B: 100µl di omogenato sono stati processati con Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG Düren, Germany), seguendo il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione del DNA per tessuti difficoltosi da lisare. L'eluizione è stata ottenuta con 100µl di acqua di grado per PCR scaldata a 70°C. Metodo tissues C: 100µl di omogenato sono stati processati secondo un protocollo proprio adattato da Boom et al.(1990). Dopo un'incubazione in buffer di lisi addizionato di Proteinasi K (20mg/ml) per 10 minuti a 70°C, seguita da 1 ora a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 50µl di sospensione di
Silicon dioxide (Sigma). Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente in agitazione, al fine di mantenere in sospensione la polvere, si è proceduto alla serie di lavaggi previsti dal metodo originale. L'eluizione è stata ottenuta con 100µl di acqua di grado per PCR scaldata a 56°C.
La Real-Time PCR è stata eseguita in accordo con il protocollo precedentemente pubblicato da Olvera (2004). Al fine di valutare l'eventuale presenza d'inibitori è stato introdotto un controllo interno esogeno d'amplificazione (Exogenous internal positive amplification

control - Applied Biosystems). L'analisi è stata effettuata utilizzando lo strumento iCycler iQ BioRad. Al fine della titolazione, il DNA ottenuto da ogni estrazione è stato testato in doppio.
Per la quantificazione è stato utilizzato uno standard plasmidico, preparato dalla ditta MWG, contenente la sequenza sintetica esattamente corrispondente alla ORF2 del GenBank entry AF465211 indicato nella pubblicazione presa a riferimento. E' stata predisposta una curva di titolazione da 107 a 100 copie di plasmide/µl e percorrendo a ritroso il processo di purificazione subito dal singolo campione si è risaliti al corrispondente titolo virale per ml di siero o grammo di tessuto.
Al fine di questo studio sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: presenza/assenza di segnale di fluorescenza, segnale del controllo interno d'amplificazione, ciclo soglia e conseguente titolo, e coefficiente di variazione del logaritmo del titolo sia per il singolo metodo che tra metodi.

RISULTATI

Sono state eseguite diverse prove di estrazione da campioni di siero utilizzando in parallelo il Kit Roche e Trizol LS® ottenendo qualche raro campione inibito con l'uno o con l'altro metodo e risultati comparabili in termini di logaritmo del titolo virale. Di seguito riassumiamo, (Tab.1) a carattere esemplificativo, gli esiti di una prova d'estrazione da 5 pool eseguita in doppio e in parallelo con tutti e tre sistemi d'estrazione prescelti:

Metodo	Titolo medio pool sieri in copie/ml	Positività	Controllo Interno	Titolo medio doppia estrazione singolo metodo	CV% doppia estrazione con singolo metodo
Trizol LS®	$10^{2.42}$	+/+	+/+	$10^{2.9}$	11.14%
	$10^{3.5}$	+/+	+/+	$10^{3.9}$	5.6%
	$10^{5.87}$	+/+	+/+	$10^{5.98}$	6.33%
	$10^{6.82}$	+/+	+/+	$10^{6.91}$	0.27%
	$10^{6.83}$	+/+	+/+	$10^{6.99}$	0.29%
Roche	$10^{2.42}$	-/-	+/+		
	$10^{3.5}$	+/-	+/+		
	$10^{5.87}$	+/+	+/+	$10^{5.68}$	3.44%
	$10^{6.82}$	+/+	+/+	$10^{6.95}$	2.76%
	$10^{6.83}$	+/+	+/+	$10^{6.7}$	6.1%
Macherey	$10^{2.42}$	+/+	+/+	$10^{1.9}$	13.46%
	$10^{3.5}$	+/+	+/+	$10^{3.1}$	14.4%
	$10^{5.87}$	+/+	+/+	$10^{5.95}$	11.77%
	$10^{6.82}$	+/+	+/+	$10^{6.6}$	0.64%
	$10^{6.83}$	+/+	+/+	$10^{6.8}$	1.26%

Tab.1 Confronto titolazioni eseguite in doppio e parallelo con tre sistemi d'estrazione.

Per ognuno sei 5 pools di sieri iniziali è stato calcolato il coefficiente di variazione del logaritmo del titolo ottenuto con i diversi metodi (Tab.2).

Titolo medio pool sieri in copie/ml	CV% log titolo ottenuto con i diversi metodi
$10^{2.42}$	25.1%
$10^{3.5}$	16.3%
$10^{5.87}$	6.55%
$10^{6.82}$	2.75%
$10^{6.83}$	3.3%

Tab.2 Coefficiente di variazione del logaritmo del titolo ottenuto in parallelo con i tre sistemi d'estrazione.

Come prevedibile i coefficienti di variazione sia dei logaritmi dei titoli ottenuti a seguito dell'estrazione di uno stesso campione con metodi diversi che da estrazioni di uno stesso campione col medesimo metodo sono più alti per cariche virali più basse, prossime al limite di sensibilità di 103 copie/ml. L'estrazione con il Kit Roche non ha permesso di rilevare la presenza di virus in campioni con titolo virale intorno a 103 copie per ml.
Sono state eseguite diverse prove di estrazione da campioni di linfonodi utilizzando in parallelo il metodo Trizol LS® e il metodo proprio adattato da Boom et al.(1990). Al contrario di quanto accade per i sieri, il 70% dei campioni estratti con Trizol LS® è risultato inibito totalmente. Il rimanente 30% ha dato luogo a titoli da 2 a 4 logaritmi inferiori rispetto al medesimo campione testato con il metodo proprio del laboratorio.
Riportiamo di seguito, a carattere esemplificativo, una tabella riassuntiva (Tab.3) dei risultati ottenuti da una prova d'estrazione da 5 omogenati di linfonodi eseguita in doppio e in parallelo con tutti e tre sistemi d'estrazione prescelti:

Metodo	Identificativo	Positività	Controllo Interno	Titolo medio doppia estrazione singolo metodo	CV% doppia estrazione con singolo metodo
Trizol LS®	1	-/-	-/-		
	2	+/+	-/-	$10^{4.2}$	12.5%
	3	-/-	-/-		
	4	-/-	-/-		
	5	-/-	-/-		
Boom	1	+/+	+/+	$10^{7.4}$	0.75%
	2	+/+	+/+	$10^{8.7}$	0.71%
	3	+/+	+/+	$10^{4.7}$	8.3%
	4	+/+	+/+	$10^{4.9}$	8.5%
	5	+/+	+/+	$10^{9.2}$	0.67%
Macherey	1	+/+	+/+	$10^{5.16}$	11.5%
	2	+/+	+/+	$10^{7.5}$	0.68%
	3	-/-	+/+		
	4	+/+	+/+	$10^{4.12}$	10.4%
	5	+/+	+/+	$10^{8.7}$	0.76%

Tab.3 Confronto titolazioni eseguite in doppio e parallelo con tre sistemi d'estrazione.

I campioni di linfonodo estratti con kit Nucleospin DNA Tissue Macherey non hanno mai dato luogo a problemi evidenti d'inibizione. Ciononostante la quantità di PCV2 stimata è sempre risultata inferiore a quella dei campioni estratti con il metodo interno e non ha permesso di rilevare uno dei campioni positivi.

DISCUSSIONE

Quelli descritti sono risultati preliminari, derivanti da un'analisi a scopo orientativo, che non si è posta come obiettivo l'individuazione del miglior metodo d'estrazione del DNA per la titolazione di PCV2 con Real-Time PCR, ma di mettere in luce eventuali punti critici. I dati raccolti offrono lo spunto per importanti riflessioni. Emerge innanzitutto che la scelta del sistema d'estrazione si conferma anche per PCV2 un aspetto fondamentale dell'analisi quantitativa con Real-Time PCR. Prima di applicare metodi d'estrazione utilizzati precedentemente per la ricerca PCV2 con PCR tradizionale o dimostrati validi per altri virus è opportuno procedere ad una valutazione. Si evidenzia inoltre che per ogni tipologia di campione occorre individuare un idoneo sistema d'estrazione, prima che per eventuali differenze in termini di efficienza, per le diverse capacità di eliminare la presenza d'inibitori dell'amplificazione. Quest'ultimo emerge sicuramente come fattore critico fondamentale soprattutto per i campioni di linfonodo, suggerendo che l'utilizzo di un controllo interno d'amplificazione è indispensabile per la valutazione dei risultati.

Bibliografia

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. (1990) "Rapid and simple method for purification of nucleic acids". 28(3), 495-503.

Brunborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. (2004) "Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based Real-Time PCR". J. Virol. Meth. 122, 171–178.

Chung W., Chan W., Chaung H., Lien Y., Wu C., Huang Y. (2005) Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs J.Virol.Meth. 124, 11–19

Espy M.J, Uhl J.R, Sloan L.M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D. C., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill III F. R., and Smith T. F., (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing Clin. Mic.Rew, 19(1), 165–256.

Gunson RN, Collins TC, Carman WF. (2006) "Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting".J Clin Virol. 35(4),355-67

Ladekjær-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Stadejek T., Storgaad T., Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Allan G., Bøtner A. (2002) "Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2)". Vet. Microbiol. 89, 97–114.

Liu Q., Wang L., Willson P., Babiuk A., (2000) "Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome". J. Clin. Microbiol. 38, 3474–3477.

Niesters H.G.(2001)"Quantitation of viral load using real-time amplification techniques".Meth. 25(4),419-29.

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 postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". J. Virol. Meth. 117, 75–80.

Rosell C., Segalés J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arrioja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., Domingo M., (1999). "Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs". J. Comp. Pathol. 120, 59–78.

Rovira A., Balasci M., Segalés J., Garc´ıa L., Plana-Duran J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A., Domingo M. (2002) " Experimental inoculation of convention pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2". J. Virol 76, 3232–9.

Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease". Vet.Microbiol. 98 (2), 137–149.

PERCORSO DIAGNOSTICO PRE E POST VACCINAZIONE PER PCV2 IN UN ALLEVAMENTO CON PCVAD/PMWS SUBCLINICA

DIAGNOSTIC APPROACH BEFORE AND AFTER VACCINATION FOR PCV2 IN A SUBCLINICAL PCVAD/PMWS HERD

LUPPI A.[1], BONILAURI P.[1], MAZZONI C.[3], SPAGGIARI B.[1], MAIOLI G.[1], LEONELLI R.[1], DI LECCE R.[2], BORRI E.[3], TONON F.[3], GRADELLINI S.[3], FERRARI E.[4], DOTTORI M.[1]

[1] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Sezione di Reggio Emilia***
[2] ***Università degli studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria***
[3] ***Libero professionista***
[4] ***AUSL Modena – Distretto di Carpi***

Parole Chiave: PCV2,PCVAD, PMWS, vaccinazione

Key Words: PCV2,PCVAD, PMWS, vaccination

Riassunto. L'applicazione di un percorso diagnostico basato sull'impiego della citologia linfonodale e della real time PCR sul siero e sui linfonodi di suini, prima dell'impiego della vaccinazione per PCV2, può essere d'ausilio alla comprensione dell'incidenza della PCVAD (*Porcine Circovirus Associated Diseases*) e delle infezioni sub-cliniche. L'applicazione del percorso diagnostico in tre momenti diversi e cioè alla comparsa di problemi sanitari riconducibili a PCVAD/PMWS, 5 mesi dopo e successivamente alla vaccinazione, ha permesso di evidenziare nelle fasi pre-vaccinazione, elevati titoli virali sierici e linfonodali tramite Real Time PCR in animali di 12 settimane di vita, non sempre accompagnati da una diagnosi cito-istologica di PCVAD/PMWS. In seguito a vaccinazione, sui campioni di sangue di animali di 5, 12 e 19 settimane di vita, vaccinati a 3 settimane dalla nascita, la Real Time PCR non ha evidenziato la presenza di animali viremici (Real Time PCR negative).
Tuttavia, sia i risultati della vaccinazione, sia quelli ottenuti dall'impiego del percorso diagnostico necessitano di ulteriori approfondimenti.

Abstract. *A field study was conducted to investigate the use of a diagnostic approach, based on lymph-nodal cytology and sera and lymph-nodal Real Time PCR on pigs, after and before the vaccination against PCV2. This approach can help the understanding of PCVAD (Porcine Circovirus Associated Disease) and sub-clinical PCV2 infection herds severity. The diagnostic approach was performed in three different periods, on the set up of health problems, due to PCVAD/PMWS, five months later and after the vaccination. This study showed high sera and lymph-nodal Real Time PCR viral load in 12 weeks old pigs, not always with a confirmatory diagnosis of PCVAD/PMWS, before the vaccination in the herds. 3 weeks old pigs vaccinated didn't show viremia at 5, 12 and 19 of age. The vaccination and the diagnostic approach results need of further investigations.*

PREMESSE

Nel 1996 una nuova malattia chiamata "*Post-weaning multisistemic wasting syndrome*" (PMWS) venne descritta in Canada e il *Porcine circovirus type 2* (PCV2) è stato identificato come l'agente causale di questa sindrome. Questa colpisce prevalentemente animali di 5-15 settimane d'età e la sintomatologia clinica include l'aumento della mortalità, deperimento, linfoadenomegalia generalizzata, sintomatologia respiratoria ed occasionalmente pallore della carcassa, ittero e diarrea. La diagnosi richiede, oltre alla presenza dei sintomi sopraccitati, la dimostrazione delle classiche lesioni istologiche soprattutto a livello dei tessuti linfoidi e del PCV2 a livello delle lesioni stesse (12).
Un criterio alternativo per arrivare alla diagnosi è la determinazione delle particelle virali a livello del siero ematico attraverso l'impiego della Real Time PCR, in associazione alla presenza dei caratteristici sintomi clinici. In tal modo, animali con infezione sub-clinica avrebbero meno di 10^6 copie di DNA di PCV2/ml di siero, mentre, suini affetti da PMWS presenterebbero un numero di copie superiore a 10^6, potendo raggiungere livelli di viremia con 10^{12} copie di DNA di PCV2/ml di siero (1, 4, 5, 11).
Per il controllo della malattia, che dimostra avere un notevole impatto economico sulla suinicoltura mondiale, sono stati fatti numerosi sforzi sia intervenendo sui presunti fattori predisponenti (stress, confezioni, ecc.), sia attraverso la produzione di un presidio vaccinale efficace. Questo ha portato alla produzione di vaccini basati sull'induzione di una risposta immunitaria nei confronti dell'open reading frame 2 (ORF2), codificante per la proteina capsidica del PCV2, identificata come l'antigene virale dotato di maggior potere immunogeno in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva.
L'impiego di questi vaccini ha dimostrato una buona efficacia nel ridurre le perdite associate a casi clinici di PCVAD/PMWS, tuttavia la presenza della viremia da PCV2, senza evidenza di PCVAD/PMWS clinica, ha dimostrato avere comunque un impatto negativo sulle performance produttive e sulle perdite totali (mortalità e scarti) in allevamento (2).
Il presente lavoro presenta l'applicazione di un protocollo diagnostico basato sulla valutazione e gradazione delle lesioni linfonodali tramite esame citologico (6,7,12) e sulla contemporanea determinazione quantitativa della presenza del PCV2 in siero e linfonodi in animali di diversa età, pre e post vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Allevamento
Allevamento a ciclo chiuso di circa 170 scrofe, collocato nella pianura padana, a gestione tipicamente famigliare. La genetica era aziendale, la rimonta interna e come verro terminale veniva impiegato un Duroc Italiano. Dopo lo svezzamento, effettuato a circa 32 giorni d'età, i suinetti erano collocati in un unico ambiente, suddiviso in gabbiette rialzate da circa 10 soggetti l'una. Dopo tre settimane di permanenza in tali strutture, i suinetti venivano trasferiti in un reparto a terra in box multipli da circa 40 capi. L'azienda non segue un rigido "pig flow" così come un rigoroso vuoto sanitario. Dopo circa 10-12 settimane di permanenza in questi reparti, i magroni venivano spostati nel reparto di ingrasso, dove vi rimanevano fino ad un peso di 160-170kg, quando venivano inviati allo stabilimento di macellazione.
La sintomatologia clinica era caratterizzata da forte dimagramento, disoressia, pallore, respiro accelerato, enterite, atassia locomotoria e refrattarietà ai più diversi trattamenti antibiotici e

faceva la sua comparsa attorno alla quarta settimana dopo lo spostamento a terra, quindi a circa 12 settimane di vita. La mortalità non era molto marcata, ma l'incidenza di scarti stava assumendo, con il passare del tempo, connotati sempre più preoccupanti. In ogni caso si registravano circa un 6-7% di perdite totali (foto 1).

Foto 1: Box contenente animali deperiti e sottopeso
Picture 1: Box with wasted and low body weight animals

Percorso diagnostico (fase preliminare)
Nel mese di Aprile 2008, in seguito al persistere dei problemi sanitari sopraccitati e delle scarse performance produttive si è proceduto all'impiego di un percorso diagnostico basato sul prelievo di sangue da 19 animali (5 animali di 5 settimane, 5 animali di 12 settimane, con sintomatologia clinica PMWS compatibile, 5 animali di 12 settimane e 4 animali di 19 settimane d'età) (Tabella 1).

Tabella 1: Categorie di animali sottoposte alla fase preliminare dello studio.
Table 1: Descriptive data of animals used in the preliminary phase of the study.

Gruppo	Età	Sintomatologia	Es. citologico su linfonodi
A (5 suini)	5 settimane	Nessuna	No
B (5 suini)	12 settimane	PMWS compatibile	Si
C (5 suini)	12 settimane	Nessuna	No
D (4 suini)	19 settimane	Nessuna	No

Dai campioni di sangue è stata eseguita la ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR. I 5 soggetti di 12 settimane, classificati come "clinici", sono stati sacrificati ed i relativi linfonodi inguinali sono stati prelevati per l'esecuzione di indagini citologiche per impronta, nell'intento di verificare la presenza di quadri citologici compatibili con una diagnosi di PMWS.

Approfondimento diagnostico
Cinque mesi dopo dal primo prelievo è stato eseguito un ulteriore campionamento di 10

animali di 12 settimane d'età (5 asintomatici e 5 con sintomatologia clinica compatibile con una diagnosi di PMWS), sui quali è stato eseguito un prelievo di sangue per la ricerca e la quantificazione di PCV2 tramite Real Time PCR. I 5 animali "clinici" sono stati sacrificati ed i linfonodi inguinali prelevati, per l'esecuzione di indagini citologiche ed istologiche, oltre alla determinazione quantitativa di PCV2, tramite Real Time PCR. Dai rimanenti 5 soggetti asintomatici è stato asportato per via chirurgica e previa anestesia, un linfonodo inguinale per capo, impiegando la medesima procedura (protocollo anestesiologico, via d'accesso) prevista per la riduzione chirurgica delle ernie inguinali (9, 10).

Protocollo vaccinale

A Settembre 2008, in seguito al persistere dei problemi sanitari sopraccitati, i suinetti di 3 settimane d'età sono stati sottoposti a profilassi vaccinale tramite un unica somministrazione di un vaccino del commercio che impiega l'inserzione dell'ORF2 in Baculovirus.

Post vaccinazione è stato eseguito un prelievo di sangue da 15 animali in soggetti di 5, 12 e 19 settimane di vita per l'esecuzione della ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR. Successivamente all'applicazione della profilassi vaccinale si è proceduto alla valutazione della percentuale di perdite totali (mortalità e scarti).

Esame citologico

I preparati citologici sono stati allestiti tramite impronta di una sezione linfonodale, essiccati all'aria e colorati tramite l'impiego del May Grunwald Giemsa. 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.

La porzione linfonodale impiegata per l'esecuzione dell'impronta per l'esame citologico è stata successivamente fissata in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione di indagini istologiche, mentre l'emisezione rimanente è stata congelata a -20°C, per essere impiegata nella indagine virologica per PCV2 tramite Real Time PCR.

Esame istologico

E' stato applicato soltanto sui campioni linfonodali raccolti durante i campionamenti di approfondimento diagnostico. I campioni di linfonodi inguinali, successivamente alla fissazione in formalina, sono stati sottoposti ad inclusione in paraffina ed impiegati per la realizzazione di sezioni di 5 µm successivamente colorate con ematossilina-eosina ed osservate al microscopio ottico.

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 2).

Tabella 2. Sequenza, localizzazione e proprietà dei primer e della sonda disegnati per la Real Time PCR del PCV-2 (Olvera A. et al., 2004).

Table 2. 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 risultati dell'indagine virologica della fase preliminare, condotta tramite Real Time PCR, sono riassunti in tabella 3, dove vengono riportati anche i dati relativi alla diagnosi citologica. I soggetti appartenenti al gruppo B hanno evidenziato un numero di copie virali di DNA di PCVII a livello del siero mediamente maggiore di 1,4 log rispetto a quello dei soggetti del gruppo C. Inoltre, andando a confrontare il risultato della PCR quantitativa tra i quattro gruppi, è possibile osservare che passando dal gruppo B al gruppo D il titolo medio virale cala progressivamente. Nel gruppo A (animali di 5 settimane di età) non è stata osservata presenza di viremia. L'esame citologico dei linfonodi inguinali dei soggetti appartenenti al gruppo B ha evidenziato su tre animali, quadri compatibili con una diagnosi di PMWS, caratterizzati da sensibile diminuzione dei linfociti, a favore di una popolazione di cellule macrofagico-istiocitarie. In due casi le impronte linfonodali hanno mostrato una popolazione cellulare caratterizzata prevalentemente da piccoli linfociti, senza quadri compatibili con una diagnosi di PMWS.

Tabella 3: Risultati della PCR quantitativa e dell'esame citologico nei quattro gruppi di suini sottoposti allo studio (fase preliminare).

Table 3: Parameters of viremia and lymph-nodal cytology results of four groups of pigs submitted to the study (preliminary phase).

Gruppo	Età	Real Time PCR log (copie di ac. nucleico virale)/ml	Diagnosi Citologica
A	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
	5 settimane	0	-
B	12 settimane	7.5	PMWS
	12 settimane	5.6	N
	12 settimane	5.9	N
	12 settimane	9.0	PMWS
	12 settimane	8.3	PMWS
C	12 settimane	5.9	-
	12 settimane	5.8	-
	12 settimane	6.8	-
	12 settimane	6.1	-
	12 settimane	4.7	-
D	19 settimane	0	-
	19 settimane	5.1	-
	19 settimane	5.1	-
	19 settimane	0	-

Legenda: N= negativo per PMWS

I risultati dell'approfondimento diagnostico sono riassunti nella tabella 4. Dai risultati della Real Time PCR appare evidente come non esistano sostanziali differenze tra i diversi animali testati. All'esame citologico quattro campioni presentavano elevata ipocellularità (NC), tuttavia la presenza significativa di cellule macrofagico-istiocitarie è stata osservata solo nel campione n°3 (P) (tabella 4). La diagnosi di PMWS è stata confermata in questo campione, mentre, in tutti gli altri casi, classificati come non conclusivi all'esame citologico, non erano presenti quadri compatibili con la sindrome in esame. Tuttavia, anche nel campione n°3, la lesione linfonodale era caratterizzata da moderata deplezione linfocitaria ed infiltrazione di cellule macrofagico-istiocitarie, con architettura linfonodale conservata, così come la presenza dei follicoli linfatici.

Tabella 4: Risultati della PCR quantitativa, dell'esame citologico e dell'istologia nel secondo gruppo di suini campionati

Table 4: Real time PCR, cytology and histology results in the second groups of pigs sampled.

Gruppo	N°	Peso degli animali al momento del prelievo (KG)	Real Time PCR log (copie di ac. nucleico virale)/ml/gr		Citologia Linfonodale	Istologia Linfonodale
			Siero	Linfonodi		
Clinica PMWS compatibile	1	24	5.1	7.6	NC	N
	2	12	7.0	5.9	NC	N
	3	12	6.2	7.8	P	P
	4	16	6.9	7.6	N	N
	5	18	6.1	8.0	N	N
Non clinici	1	33	5.0	6.3	N	N
	2	36	8.2	7.6	NC	N
	3	45	4.4	4.9	N	N
	4	42	5.4	7.9	N	N
	5	33	5.4	7.1	NC	N

Legenda: P=PMWS; N=Negativo per PMWS; NC=Non conclusivo

Infine, la ricerca di PCV2 tramite Real Time PCR sui campioni di sangue di animali di 5, 12 e 19 settimane di vita, vaccinati a 3 settimane dalla nascita, non ha evidenziato la presenza di animali viremici (Real Time PCR negative). Gli animali sottoposti a vaccinazione hanno presentato un miglioramento generalizzato, non quantificabile, delle prestazioni zootecniche. In particolare l'incidenza dei morti e degli scarti è passata al 3-4%, così com'è stato possibile ridurre considerevolmente i costi legati alle medicazioni nei mangimi delle prime fasi, senza ripercussioni negative sulla salute degli animali.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il presente lavoro riporta la preliminare applicazione di un percorso diagnostico per la valutazione dell'impatto dell'infezione da PCV2 in un allevamento con prevalente PCVAD/PMWS subclinica, passando dalla valutazione delle lesioni microscopiche linfonodali e dalla determinazione del titolo virale sia a livello sierico sia a livello linfonodale. Dai risultati riportati in tabella 3 appare evidente come animali fino a 5 settimane siano virologicamente negativi, protetti dall'immunità passiva materna da una attiva ed efficace replicazione virale. L'immunità materna decresce tra le 3 e 8 settimane di vita (3), pertanto non stupisce che animali di 12 settimane siano viremici anche ad alto titolo, come osservato nella fase preliminare del percorso diagnostico. Tra i soggetti considerati con sintomatologia clinica compatibile con PMWS, in 3 su 5 è stata confermata la diagnosi tramite l'impiego di metodi morfologici. Questi soggetti presentavano anche titoli virali nel siero superiori a 10^7 copie virali / ml.
Nel corso dell'approfondimento diagnostico, successivo, avvenuto a distanza di 5 mesi (risultati in tabella 4) solo in un caso dei cinque considerati con sintomatologia clinica compatibile è stata confermata la diagnosi di PMWS. Questo soggetto presentava titoli virali non distinguibili dai restanti animali, in cui la diagnosi di PMWS non è stata confermata.
Dopo la vaccinazione, negli animali prelevati a 5, 12 e 19 settiamene di vita, la viremia per PCV2 non è stata dimostrabile tramite Real Time PCR.
Quindi l'applicazione del percorso diagnostico proposto in questo studio ha premesso di ottenere in prima istanza una diagnosi compatibile con PMWS in 3 soggetti di 12 settimane di età, ma ad un ulteriore esame eseguito a distanza di 5 mesi questa diagnosi è stata confermata soltanto in un soggetto e soltanto tramite esame citologico confermato dall'esame istologico. La PCR quantitativa in questo caso non ha premesso di rilevare differenze significative tra questo soggetto e i rimanenti soggetti prelevati. Anzi, in questi ultimi, un soggetto "non clinico" ha presentato un elevato titolo virale (> 107 copie / ml) sia sierico sia linfonodale, in assenza di reperti microscopici tipici della sindrome. D'altro canto la polifattorialità e la complessità di questa sindrome sono concetti sempre più diffusi. Non bisogna comunque sottovalutare il ruolo che la viremia prolungata da PCV2, può avere tanto sul sistema immunitario quanto sul metabolismo dell'animale. Inoltre è bene ricordare la contemporanea presenza di altre forme virali che si sovrappongono in questa giovane fascia d'età. Peraltro tali situazioni hanno per lunghi anni confuso, e spesso ancora oggi lo fanno, la corretta diagnosi di questa sindrome.
Dopo l'applicazione del protocollo vaccinale, si è osservata la negatività alla PCR in soggetti di 5, 12 e 19 settimane vita testimoniando una assenza di viremia rilevabile.
Da quanto si può evincere dai risultati del percorso diagnostico applicato all'allevamento in studio prima della vaccinazione, questo presentava una diffusa positività in PCR per PCV2, con titoli virali anche molto elevati e con quadri microscopici linfonodali compatibili con PMWS soltanto in alcuni soggetti. Le perdite osservate si attestavano intorno al 6-7%. Una situazione come quella descritta propende per un allevamento con sintomatologia causata da PCV2 di media gravità e/o con una

PCVAD/PMWS sub-clinica.
In questo allevamento la vaccinazione ha migliorato le performance produttive diminuendo le perdite (3-4%) e ha permesso di ottenere soggetti con viremia assente o non più rilevabile tramite PCR. Le osservazioni eseguite nell'allevamento oggetto dello studio troverebbero conferma in precedenti lavori che descrivono l'influenza negativa esercitata dalla viremia da PCV2 anche in assenza della forma clinica, sia sulle performance produttive, sia sulla mortalità in allevamento (2).
In conclusione, alla luce dei dati precedentemente riportati, anche la sola riduzione del titolo virale e della durata della viremia, permette di osservare sensibili miglioramenti dei parametri sanitari, con conseguente vantaggio economico per l'azienda (2).
Tuttavia i risultati ottenuti con la vaccinazione e dalla applicazione del percorso diagnostico devono assolutamente ritenersi di tipo preliminare e necessitano di ulteriori approfondimenti, attraverso l'applicazione di un disegno sperimentale che preveda l'impiego contemporaneo di animali vaccinati e non allevati nelle stesse condizioni ambientali e temporali.

Bibliografia

1. Brumborg I.M., Moldal T., Jonassen C.M. Quantitation of Porcine Circovirus Type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. J. Virol. Methods 2004; 122 (2) :171-178.
2. Fachinger V., Bischoff R., Jedidia B.S., Saalmuller A., Elbers k. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. Vaccine (2008); 26:1488-1499.
3. Fort A., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F., Segalés J. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. Vaccine 2008; 26:1063-1071.
4. Krakovka S., Ellis J., McNeilly F., Waldner C., Alla G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. J. Vet. Diagn Invest 2005; 17:213-222
5. Liu Q., Wang L., Wilson P., Babiuk L.A. Quantitative,competitive PCR analysis of Porcine Circovirus DNA in in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health Prod. 2006;8:133-136.
6. Luppi A. Imprint cytological examination in PMWS diagnosis. Veterinary Record (2003); 152, (5), 148.
7. Luppi A., Bonilauri P., Di Lecce R., Paoletti F., Bosetti M., Cordioli P. Clinical and pathological investigation in an outbreakof PMWS and diagnostic methods comparison. P. 49; Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008.
8. 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.

9. Mazzoni C., Gradellini S. Esperienze di anestesia nel suino in condizioni di campo. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme, Parma, Italia, 25-26 Marzo 2004, p.237-243.
10. Mazzoni C., Gradellini S., Tono F. Tecnica di riduzione chirurgica dell'ernia inguinale nel suino. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXXI Meeting Annuale, Mantova, Italia, 17-18 Marzo 2005, p.429-435.
11. Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J., Domingo M. 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 (2004); 117 (1):75-80.
12. 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.

INDAGINI VIROLOGICHE NEI CONFRONTI DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) NEL CENTRO ITALIA: RISULTATI PRELIMINARI

VIROLOGICAL INVESTIGATIONS AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) IN CENTRAL ITALY : PRELIMINARY TESTS

STEFANO PETRINI[1], MATTEO SABBATINI[1], VALENTINA SILENZI[1], SIMONE BAROCCI[1], FRANCESCA CIUTI[1], GIOVANNI PEZZOTTI[2], MANFREDO FORTUNATI[1], MARTA PANICCIÀ[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sez. Diagn. di Fermo (AP);*
[2]*Istituto Zooprofilatico Sperimentale dell' Umbria e delle Marche, Perugia (PG).*

Parole chiave: PCV2, suini, organi, isolamento virale, PCR.

Key words: PCV2, swine, virus isolation, PCR.

Riassunto. Il Circovirus suino tipo 1 (PCV1) è diffuso nel suino ma non è considerato patogeno. Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è clinicamente associato ad una malattia debilitante denominata sindrome del dimagramento post-svezzamento (PMWS). In questo studio preliminare, sono stati raccolti 205 campioni d'organo provenienti da 44 allevamenti suini situati nel territorio Umbro-Marchigiano, per le indagini virologiche nei confronti di PCV2. I risultati evidenziano la presenza dell'infezione virale negli organi saggiati in una percentuale variabile dal 16,66% nel fegato al 45,45% nei linfonodi. Inoltre, i campioni risultati positivi provenivano per il 21,73 % delle aziende situate nella Regione Marche, mentre per quanto attiene alla Regione Umbria si accertava il 42,85% di positività alla stessa infezione virale. Complessivamente, dalle aziende saggiate, 14 sono risultate positive al virus PCV2 con una percentuale pari al 31,81%.

Abstract. Porcine Circovirus type 1 (PCV1) is considered to be widespread in pigs but non-pathogenic. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is considered as the causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in domestic pigs. In these preliminary tests, we present the results of samples collection for virological investigations against PCV2 from 44 swine breeding farms inside Marche or Umbria geographical area. The results evidenced virological positivity against PCV2 in organs ranging from 16,66 % (liver) to 45,45% (lymph nodes). Moreover, the positive samples from 21,73% to 42,85% were collected from Marche or Umbria geographical area respectively. Altogether, from all swine farms examined, 14 herds had 31,81% positivity to PCV2.

INTRODUZIONE

I virus appartenenti alla Famiglia *Circoviridae* genere Circovirus, sono stati descritti nel suino (circovirus del suino, PCV), nel pollo (virus dell'anemia del pollo, CAV), nei psittacidi e nei piccioni (PBFDV). Le stesse infezioni sono associate rispettivamente a specifici ospiti (Ritchie

et al., 1989; Todd *et al.*, 2001; Chae, 2005).
Il Circovirus suino tipo 1 (PCV1) è ubiquitario nel suino, ma non sembra essere responsabile di manifestazioni cliniche in animali adulti, mentre il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è clinicamente associato ad una malattia debilitante denominata sindrome del dimagramento post-svezzamento (PMWS). In alcune circostanze l'infezione da PCV2 è stata anche associata a nefrite interstiziale (Sarli *et al.*, 2008) e dermatite suina (PDNS), in associazione alla PMWS (Segales *et al.*, 2005). PCV2 risulta essere estremamente diffuso in Europa, USA e Canada (Todd *et al.*, 2001). In particolare la presenza di anticorpi nei confronti di PCV2 è stata dimostrata in percentuali prossime al 100%, sia tra allevamenti di suidi domestici che all'interno degli stessi. Sebbene negli ultimi anni si sia riscontrato un certo decremento nel numero di episodi patologici con quadri clinici tipici dell'infezione da PCV2, i livelli di mortalità e le perdite indirette legate all'infezione, sembrano essere rimaste pressoché costanti (Segales *et al.*,2007). Ad oggi, le informazioni relative alla presenza del virus negli allevamenti suini italiani risultano incomplete. Per quanto riguarda il territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM), precedenti indagini hanno dimostrato la presenza del virus nei suidi selvatici (Petrini *et al.*, 2008). Scopo del presente lavoro è stato quello di riportare i risultati delle indagini effettuate nel periodo settembre 2007 - dicembre 2008 presso la Sezione diagnostica di Fermo dell'IZSUM. In particolare i dati ottenuti sono relativi alle indagini virologiche effettuate su campioni d'organo di soggetti con sintomatologia clinica riferibile e/o associata ad infezione da PCV2, provenienti da allevamenti suini del territorio Umbro Marchigiano.

MATERIALI E METODI

Animali e campioni
Lo studio ha previsto la raccolta di campioni d'organo per l'isolamento virale provenienti da 44 aziende suine che non effettuavano la vaccinazione nei confronti di PCV2, di cui 21 situate nella Regione Umbria e 23 nel territorio Marchigiano. I suini (ibridi commerciali) sono stati recapitati presso l'IZSUM per accertamenti diagnostici sia da veterinari pubblici che da veterinari aziendali. In sede di esame necroscopico, sono stati prelevati, in funzione delle lesioni macroscopiche osservate, 205 campioni d'organo come evidenziato nella tabella 1.
Isolamento virale
5 grammi di ciascun campione sono stati omogenati in 15 ml di terreno minimo essenziale, MEM (Lonza, Milano, Italia) e centrifugati (Eppendorf 5804 R) a 850 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante dopo essere stato filtrato a 0,45 µm e aggiunto di 5000 U.I. di penicillina, 5000 U.I. di streptomicina e 25 µg/ml di fungizone (Lonza, Milano, Italia) per 4 ore a temperatura ambiente (22°C), è stato inoculato su piastre Costar® 24 (Corning, NY, USA) contenenti culture cellulari di rene neonatale di suino (NSK), clone BS CL 177 (Ferrari et al., 2003). Le cellule prima del loro utilizzo sono state saggiate per l'assenza del Circovirus suino tipo1 (PCV1), del Circovirus suino tipo 2 (PCV2), del virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRSV), e del virus di Aujeszky (PRV). Tre pozzetti di ciascuna piastra sono stati utilizzati per ciascun campione. Dopo aver fatto adsorbire i campioni sulle colture cellulare di cui sopra, per 1 ora a temperatura ambiente (22°C), le piastre sono state poi incubate a 37°C in presenza del 5% di CO2. Le stesse sono state controllate giornalmente per la presenza di effetto citopatico e/o tossico e, a distanza di 10 giorni l'uno dall'altro, sono stati effettuati 3 passaggi seriali. Al fine di rilevare la presenza virale, dal surnatante delle colture

sopramenzionate è stata eseguita la PCR. Gli stipiti di PCV2 isolati sono stati poi registrati e conservati a – 80°C per l'allestimento di una collezione virale.

PCR

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita con kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Milano, Italia) da singoli omogenati (1:5 in PBS) d'organi. La PCR è stata effettuata secondo il protocollo descritto da 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 minuto; 35 cicli a 94°C x 1 minuto; 55°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto; l'estensione finale a 72°C x 10 minuti. 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, Milano, Italia) e come marker di peso molecolare è stato utilizzato il *ladder* 100 bp (Celbio, Milano, Italia).

RISULTATI

Dagli animali sottoposti ad esami necroscopici è stato possibile accertare, in generale, la presenza di condizioni organiche scadenti, associate ad atrofia muscolare, anemia, pallore delle mucose ed aumento di volume dei linfonodi tracheo-bronchiali, inguinali e meseraici. In particolare questi ultimi si presentavano di colore bianco-grigiastro e con superficie esterna multilobulata. Dalle colture cellulari inoculate con gli organi precedentemente menzionati, non è stato evidenziato alcun effetto citopatico (Figura 1). Mentre dalle indagini di biologia molecolare condotte dal surnatante delle stesse cellule, è stato possibile amplificare la sequenza genomica ORF2 di PCV2 in 74 campioni d'organo con una percentuale di positività variabile dal 16,66% nel fegato al 45,45% nei linfonodi degli organi saggiati (Tabella 1) e provenienti da 14 aziende suine (Figura 2). Gli animali risultati positivi provenivano in 9 casi da aziende Umbre (42,85%) e 5 da allevamenti Marchigiani (21,73%). Complessivamente, considerando un totale di 44 aziende esaminate nel territorio Umbro-Marchigiano, 14 sono risultate positive al virus PCV2 con una positività pari al 31,81% (Tabella 2).

DISCUSSIONE

L'infezione da PCV2 risulta estremamente diffusa in tutto il territorio europeo, nord america e Canada. Sebbene negli ultimi anni si sia riscontrato un certo decremento nel numero di episodi riferibili ad infezione da PCV2 sia in Europa che in alcuni Paesi Asiatici, i livelli di mortalità e le perdite economiche causate da questo virus sembrano essere rimasti pressoché costanti (Segales *et al.,*2007). I risultati ottenuti nella presente indagine dimostrano la presenza dell'infezione da PCV2 anche negli allevamenti di suidi domestici del territorio Umbro-Marchigiano. La presenza del virus è stata sempre associata ad animali che provenivano da aziende nelle quali si era osservata una sintomatologia di tipo respiratorio e/o riproduttivo e che presentavano lesioni macroscopiche riferibili ad infezione da PCV2. In particolare i quadri anatomo-patologici evidenziavano forme di polmonite apicale, linfoadenopatia generalizzata associata a pallore o aspetto emorragico dei linfonodi, epatiti e nefriti. A fronte di questi quadri macroscopici, le indagini virologiche hanno confermato la presenza del virus principalmente

nel tessuto linfatico (linfonodi, milza) seguito da rene e polmone. I risultati ottenuti in questa indagine sono in accordo con quelli ottenuti da altri Autori (Vincent et al., 2005). E' noto, infatti, che il PCV2 ha il suo tropismo a livello del tessuto linfatico con particolare riferimento ai monociti circolanti. La persistenza virale instaurata dal virus in queste cellule non altera l'attività immunomodulatoria delle stesse, ma interferisce con la produzione di diverse citochine tra cui l'interferon-γ (INF-γ), determinando una immunosoppressione dell'ospite e predisponendo di conseguenza l'organismo all'insorgenza di infezioni batteriche secondarie e/o virali (Segales *et al.,* 2004).
In questo studio, le positività virologiche evidenziate sono tutte riconducibili a stipiti virali di campo, in quanto, al momento delle indagini, nessuna delle aziende saggiate effettuava la vaccinazione nei confronti di PCV2.
Da tutti gli stipiti isolati, verranno successivamente allestite prove di sequenziamento genetico per valutare l'omologia genomica con altri stipiti virali presenti nella banca dati elettronica GenBank, oltre a verificare se tali stipiti appartengono al sottogruppo 2a (PCV2a) o 2b (PCV2b).

CONCLUSIONI

I risultati di questa indagine preliminare depongono per un ampia diffusione dell'infezione da PCV2 negli allevamenti suini presi in considerazione, in virtù del fatto che le aziende considerate non eseguivano programmi di profilassi vaccinale. Il rilievo di PCV2 da animali con sintomatologia respiratoria e/o riproduttiva in suini situati nel territorio Umbro-Marchigiano supportano l'ipotesi che l'infezione da PCV2 svolga un ruolo eziologico importante nell'insorgenza delle manifestazioni cliniche respiratorie e/o riproduttive in questa area geografica.
In termini di prospettive di lavoro sul PCV2, per approfondire le conoscenze relative al meccanismo patogenetico dell'infezione, con particolare riferimento all'azione immunosoppressiva, presso la Sezione diagnostica di Fermo è stato anche avviato un progetto di ricerca riguardante lo studio dell'immunità umorale e cellulo-mediata in suini sottoposti a nuovi presidi immunizzanti nei confronti di PCV2.
Per quanto attiene invece l'attività più strettamente diagnostica, è in previsione l'utilizzo di una prova sierologica ELISA, per la diagnosi indiretta di PCV2, da affiancare a prove di tipo diretto.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Maura Ferrari dell'IZSLER, di Brescia per aver fornito le colture cellulari e la Dott.ssa Rosita Vignini dell'Associazione Provinciale Allevatori (APA) della provincia di Ascoli Piceno per aver collaborato alla raccolta dei campioni.

Bibliografia

Chae C. (2004) "Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology" Vet J 168:41-49.

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.

Ferrari M., Scalvini A., Losio M.N., Corradi A., Soncini M., Bignotti 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 Meth 107:205-212.

Petrini S., Gavaudan S., Barocci S., Briscolini S., Sebastiani C., Mancini P., Paniccià M., Villa R., Ferrari M. (2008) "Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di circovirus suino tipo 2 (PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia" Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), Salsomaggiore Terme 13-14 Marzo, pp. 239-245.

Ritchie B.W., Niagro F.D., Lukert P.D. (1989) "Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. Virol 171: 83

Sarli G., Mandrioli L., Panaresi S., Brunetti B., Segales J., Dominguez J. and Marcato P.S. (2008) "Characterization of interstitial nephritis in pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome" Vet Pathol 48:12-18.

Segales J., Domingo M., Chianini F., Majo N., Dominguez J., Darwich L., Mateu E. (2004) "Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting sindrome affected pigs" Vet Microb 98:151-158.

Segales J., Allan G., Domingo M. (2005) "Porcine circovirus diseases" Anim Heal Res Rev 6(2):119-142.

Segales J. (2007) "PMWS, PCV2…e cos'altro?" Atti del XXXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Ssuini (SIPAS), Modena 29-30 Marzo, pp. 87-90.

Todd D., McNulty M.S., Adair B.M., Allan G.M. (2001) " Animal circovirus" Adv Vir Res 57:1-70.

Vincent I.E., Carrasco C.P., Piriou L.G., McNeilly F., Allan G.M., Summerfield A., McCullough K.C. (2005) "Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2" Immun 115, 388-398.

Tabella 1. Campioni d'organo utilizzati per le indagini virologiche nei confronti di PCV2 con prevalenza (%) dell'infezione nei vari tessuti.

Table 1. Sample organs used for virological investigations against PCV2 with tissue prevalence (%).

Organi	No. saggiati	No. positivi	% positivi	No. negativi	% negativi
Polmone	75	30	40%	45	60%
Rene	12	5	41,66%	7	58.34
Fegato	24	4	16,66%	20	83.34
Milza	42	19	45,23%	23	54.77
Tonsilla palatina	1	0	0	1	100%
Linfonodi *	33	15	45,45%	18	54,55%
Intestino	6	0	0	6	100%
App.riprod.**	3	0	0	3	100%
Aborti	9	1	11,10%	8	88,90%
Totale	205	74	36,10%	131	63,90%

* Inguinali, tracheo-bronchiali, meseraici; ** Utero, corno uterino, ovaio

Tabella 2. Regioni di provenienza dei campioni saggiati per presenza del Circovirus suino tipo 2 (PCV2).

Table 2. Geographical area of the samples tested for the presence of the Porcine Circo virus type 2 (PCV2).

Regioni	No. Aziende	Aziende con positività virologica	
		No.	%
Marche	23	5	21,73%
Umbria	21	9	42,85%
Totale	44	14	31,81%

Figura 1. Colture cellulari NSK 7 giorni post-inoculo, 40X colorazione H&E.
Figure 1. Neonatal Swine Kidney cell culture 7 days post inoculation, 40X stained H&E.

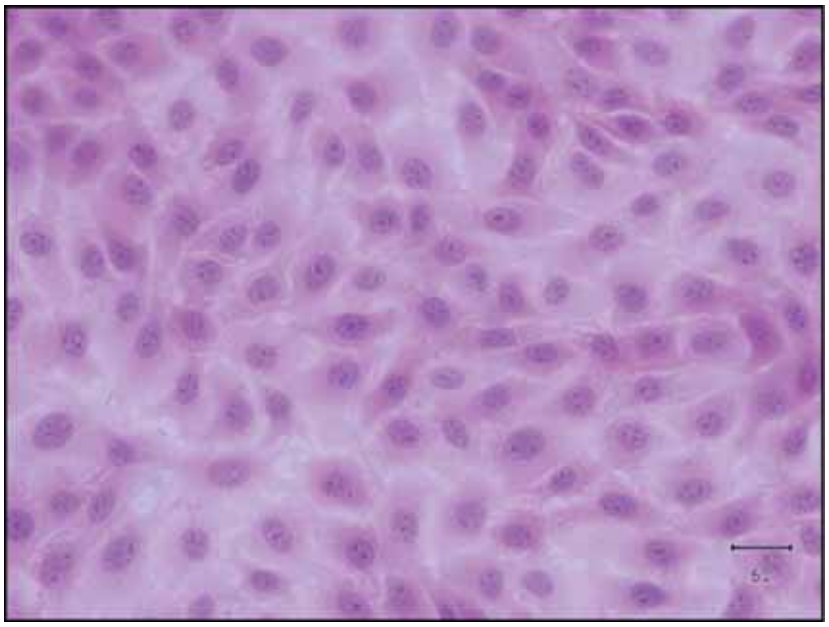
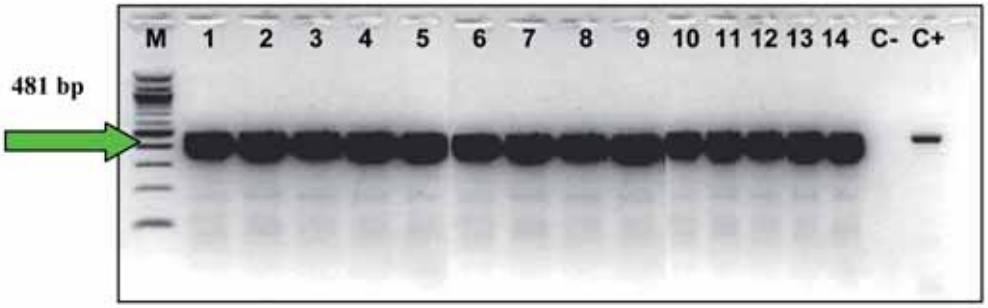


Figura 2. Elettroforesi su gel di agarosio (2%) dei prodotti di PCR eseguita da surnatante di colture cellulari (NSK) inoculate con campioni d'organi positivi (M=ladder 100 bp; campioni positivi da n. 1 a n. 14; C-= controllo negativo; C+=controllo positivo).
Figure 2. PCR reaction from supernatant of NSK cell cultures inoculated with positive organs (M=ladder 100 bp; positive samples from n. 1 to n. 14; C- negative control; C+ positive control).



INDAGINE SULLA GRANULOMETRIA DEI MANGIMI IN ALCUNI ALLEVAMENTI DI SUINI IN PROVINCIA DI CUNEO

A SURVEY ON FEED GRANULOMETRY IN SOME SWINE BREEDING FARMS IN THE PROVINCE OF CUNEO

BOTTA ELENA*, CAREDDU M.ELENA, MASSA MANUELA*, BARICCO GIUSEPPE*****

** Medico Veterinario Libero Professionista, Torino,*
Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN),
Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino;
*** I.Z.S. Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Cuneo;*
**** Medico Veterinario Libero Professionista, Torino*

Parole chiave: granulometria, mangime, analisi granulometriche

Keywords: particle size, feed, granulometric analysis

Riassunto. Una macinazione particolarmente fine dei mangimi per suini aumenta la digeribilità dell'alimento, migliora l'indice di conversione alimentare e l'uniformità della razione, ma può anche portare ad alcune conseguenze negative, quali una maggiore incidenza di ulcere gastriche e di problemi respiratori in uomini ed animali legata alla maggiore polverosità; nella specie suina è stata anche dimostrata una relazione diretta tra finezza di macinazione dei mangimi ed incidenza della salmonellosi.
Il seguente lavoro ha avuto come obiettivo quello di confrontare la granulometria di diversi campioni (n= 31) di mangimi prelevati in aziende suinicole della provincia di Cuneo, con il profilo granulometrico ideale.
I risultati ottenuti permettono di asserire che come valori medi i mangimi analizzati non si discostano molto dai riferimenti dettati dalla distribuzione granulometrica ideale, sebbene il particolato dei mangimi per i suini all'ingrasso risulti generalmente più fine del necessario. Infine, non sono state notate differenze di riguardo tra la granulometria dei mangimi industriali e tra quella dei mangimi autoprodotti.

Summary. In swine units, fine grinding increases feed digestibility, improving feed conversion and feed uniformity: on the other side some negative effects can be linked to fines, like increased incidence of gastric ulcers, respiratory disorders in humans and animals (ralated to increased enviromnmental dustness); in swine a direct relation between finess of milling and Salmonella incidence has been demonstrated.
We have compared the granulometry of 31 feed samples coming from swine farms located in the Cuneo area (NW Italy) with the ideal particle size distribution.
Results show that as average the feeds are not far from the ideal profile, although the finishing feeds appear to be more finely grinded than the needs: no difference has been noted depending on the origin (home-mixed or industrial) of the tested feeds.

INTRODUZIONE

L'utilizzazione dei mangimi nell'allevamento suino è un fattore critico per la redditività economica dell'azienda stessa: è stato calcolato che fino all'80% del costo di produzione di un suino può, in certe condizioni di mercato, essere rappresentato dal costo del mangime. Quindi, risulta indispensabile per la redditività aziendale riuscire a gestire al meglio l'alimentazione degli animali, facendo attenzione non solo alla qualità del composto, ma anche alla sua trasformazione.
Per definizione, la granulometria di un mangime è il termine che si riferisce alla dimensione delle singole particelle che lo compongono ed è direttamente collegata alla finezza di macinazione delle materie prime.
Nella dieta dei suini, i cereali rappresentano la fonte primaria di energia, pertanto è opportuno porre attenzione oltre che alle loro proprietà nutritive, anche alle tecniche di lavorazione a cui essi vengono sottoposti: i vantaggi che derivano dalla formulazione di diete ben bilanciate possono venire persi se non si pone altrettanta attenzione alle metodologie di produzione.
Come si evince dalla letteratura la macinazione, ovvero la riduzione dell'alimento in piccole particelle effettuata attraverso mulini a martelli o a cilindri, ha diversi obiettivi:
1) aumentare la superficie di contatto con le secrezioni dell'apparato digerente, migliorando la digeribilità delle proteine e delle altre sostanze nutritive poiché particelle più piccole presentano una maggiore superficie di interazione con gli enzimi digestivi;
2) migliorare l'indice di conversione dell'alimento;
3) migliorare l'uniformità della razione, permettendone una manipolazione più facile da parte dell'operatore.
Tuttavia, ridurre eccessivamente la granulometria di un mangime può avere anche ripercussioni negative sull'economia dell'azienda.
Gli svantaggi derivanti da una macinazione troppo fine sono i seguenti:
1) maggiore incidenza di ulcere gastriche; infatti, quando la dimensione media delle particelle è uguale o inferiore ai 4-500 μ, si è nella situazione che tipicamente favorisce l'insorgenza dell'ulcera gastrica nel suino: le farine fini provocherebbero un maggior grado di rimescolamento della massa contenuta nello stomaco, con conseguente esposizione più prolungata della mucosa della pars oesophagea a materiale di provenienza distale caratterizzato da un pH particolarmente basso. La seconda correlazione discende dalla maggiore velocità di svuotamento dello stomaco indotta dalle farine fini: questo favorirebbe la risalita dei succhi biliari fino alla mucosa della pars oesophagea, sulla quale agirebbero in modo da favorire l'instaurarsi di fenomeni erosivi ;
2) riduzione dell'assunzione di alimento;
3) aumento della polverosità con il conseguente aumento dei problemi respiratori in uomini e animali. Le polveri, particolarmente quelle < a 24 μ (polveri respirabili), agiscono come irritanti della mucosa tracheobronchiale, esitando in deficit morfofunzionali dell'epitelio, che perde la propria capacità di moto ciliare e produce muco in eccesso. Inoltre, esse sono uno dei principali veicoli di trasporto degli agenti infettivi nella profondità del sistema respiratorio, agendo come carrier organico e protettivo nei confronti dei patogeni. La polverosità ambientale all'aria aperta è di

circa 0,1 mg /m3: all'interno delle porcilaie essa si situa da 1 a 10 mg /m3, da 10 a 100 volte di più. Essa viene condizionata dal numero e peso degli animali per unità di superficie, dalla temperatura ambientale, dall'umidità relativa, dal tasso di ricambio dell'aria, ma anche dalla composizione e dalle modalità di preparazione e distribuzione del mangime;
4) aumento dei costi di produzione del mangime.
Infine, è bene ricordare l'importanza di una granulometria non troppo fine per quanto concerne il problema della salmonellosi che, come è noto, è una delle principali cause di zoonosi: un'adeguata gestione alimentare può contribuire significativamente al controllo di questa infezione limitando contemporaneamente anche l'uso dei farmaci.
In tutti gli studi riportati, sia di tipo sperimentale che derivanti da indagini di tipo epidemiologico, si è messa in evidenza una forte correlazione tra granulometria elevata dei mangimi e riduzione dei casi e della prevalenza di salmonella negli allevamenti suini. Però, la questione irrisolta è quella delle prestazioni, in quanto granulometrie elevate comportano anche riduzioni delle prestazioni, sia in termini di incremento peso che di indici di conversione.
Il diametro medio delle particelle dei mangimi destinati alla specie suina dovrebbe quindi essere compreso tra i 500 e 800 µ e dovrebbe aumentare con l'aumentare dell'età degli animali. La parte finissima (<150 µ) dovrebbe essere ridotta a meno del 2,5%.
Per ottenere ciò è necessario gestire il diametro delle griglie del mulino utilizzando griglie da 2 mm fino a 4 mm: scopo principale sarà, come visto, il contenimento del particolato inferiore a 150 µ.

La verifica periodica della granulometria dei mangimi è un esame semplice e poco costoso e dovrebbe essere inserito nel programma di controllo della qualità di ciascun allevamento.

MATERIALI E METODI

Il Club Moretta è parte del programma di insegnamento della Scuola di Specializzazione in Patologia Suina dell'Università degli Studi di Torino ed è un insieme di 10 allevamenti suini a ciclo chiuso convenzionati con la Scuola, i quali vengono frequentati da coppie (o triplette) di studenti al di fuori delle ore di lezione, per la realizzazione di un piano organico di monitoraggio zootecnico e sanitario. Gli allevatori aderenti ricevono i risultati del piano a titolo gratuito, mentre gli studenti esercitano, insieme all'apprendimento teorico, anche la necessaria fase di applicazione pratica.

Per eseguire la seguente analisi granulometrica sono stati prelevati 31 campioni di mangime in 9 aziende suinicole appartenenti al Club Moretta.
I campioni di mangime analizzati sono stati suddivisi in base alla categoria di animali a cui sono destinati: sono stati considerati mangimi per lo svezzamento, mangimi per i riproduttori e mangimi per l'ingrasso (Tab.1)

Tab. 1: Elenco dei mangimi in esame
Tab. 1: List of analyzed feeds

AZIENDA	MANGIMI SVEZZAMENTO	MANGIMI RIPRODUTTORI	MANGIMI INGRASSO
1	Mangime svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime scrofe ingrasso
2	Mangime svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso magroni
		Mangime scrofe lattazione	
		Mangime verri	
3	///	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso
4	Mangime svezzamento 15- 25 kg	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso
	Mangime svezzamento 8- 15 kg	Mangime scrofe lattazione	
5	Mangime svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso
6	Mangime svezzamento	Mangime riproduttori	Mangime ingrasso
7	Mangime svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso
8	Mangime 1° svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso
	Mangime 2° svezzamento		
9	Mangime svezzamento	Mangime scrofe gestazione	Mangime ingrasso

Per quanto riguarda l'origine dei mangimi è risultato che, delle 9 aziende in esame, 3 utilizzano mangimi di tipo industriale e 6 mangimi che vengono prodotti nell'azienda stessa (autoprodotti). (Tab. 2)

Tab. 2: Origine dei mangimi esaminati.
Tab. 2: Origin of analyzed feeds

AZIENDA	ORIGINE MANGIME	
	INDUSTRIALE	AUTOPRODOTTO
1	X	
2		X
3	X	
4		X
5		X
6		X
7		X
8		X
9	X	
TOTALE	3	6

Per ogni campione pervenuto, l'indagine granulometrica ha fornito come risultati le percentuali delle particelle costituenti il mangime appartenenti alle fasce dimensionali <150 µ, tra 150 e 500 µ, tra 500 e 1000 µ, > 1000 µ.

Scopo del lavoro è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dalle analisi granulometriche dei mangimi utilizzati nelle aziende del Club Moretta con i valori di un mangime di riferimento ideale che presenta le seguenti caratteristiche:

MANGIME IDEALE	DIAMETRO PARTICELLE			
	< 150 µ	150-500 µ	500- 1000 µ	> 1000 µ
	2	30	43	25

RISULTATI

Le analisi granulometriche effettuate hanno riportato i seguenti valori:

Tab. 3: Risultati delle analisi granulometriche dei mangimi in esame.
Tab. 3: Granulometric analysis results of tested feeds

AZIENDA	<150 µ	150-500 µ	500-1000 µ	> 1000 µ	TIPOLOGIA MANGIME
1	3	30,2	39,8	27	Mangime scrofe gestazione
	4,8	50,2	18	27	Mangime svezzamento
	2,8	47	36,8	13,4	Mangime scrofe ingrasso
2	10,6	36	25,2	28,2	Mangime ingrasso magroni
	2	23,4	29,4	45,2	Mangime scrofe gestazione
	2	29,4	37,2	31,4	Mangime scrofe lattazione
	1,6	40,8	25,2	32,4	Mangime svezzamento
	3,2	32,6	34	30,2	Mangime verri
3	1,8	39	34,2	25	Mangime ingrasso
	1	31,6	34,4	33	Mangime scrofe gestazione
4	0,8	7	55	37,2	Mangime scrofe lattazione
	1,4	41	35	22,6	Mangime scrofe gestazione
	2,6	48,8	36,6	12	Mangime svezzamento 15-25 kg
	1	16,8	72,4	9,8	Mangime svezzamento 8-15 kg
	2,2	44,6	37,2	16	Mangime ingrasso
5	0,2	47,6	43,2	9	Mangime ingrasso
	1,2	35	31,6	32,2	Mangime scrofe gestazione
	1,6	66,6	25,2	6,6	Mangime ingrasso

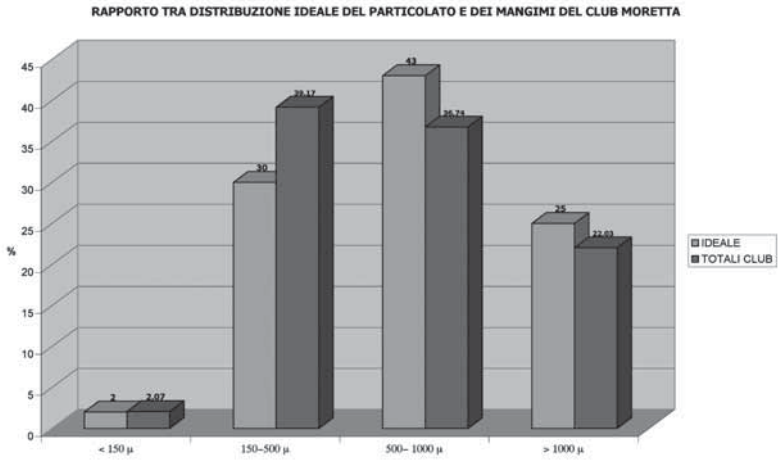
6	1,8	44,6	38,6	15	Mangime ingrasso
	0,8	35,4	36,8	27	Mangime riproduttori
	0,6	49,4	32	18	Mangime svezzamento
7	2,2	48,6	34,2	15	Mangime ingrasso
	1,8	48	29,6	20,6	Mangime scrofe gestazione
	0,6	47,2	38,2	14	Mangime svezzamento
8	1,8	29,2	45,8	23,2	Mangime ingrasso
	1	39,8	37,2	22	Mangime scrofe gestazione
	1,8	46	32	20,2	Mangime 1° svezzamento
	0,8	45,2	29,2	24,8	Mangime 2° svezzamento
9	1,8	42,2	34	22	Mangime ingrasso
	5	39,8	36,6	18,6	Mangime scrofe gestazione
	0,4	31,2	64,2	4,2	Mangime svezzamento

Il confronto con riferimento all'intera entità dei mangimi (n= 31) ha dato il seguente risultato:

MANGIME IDEALE	**DIAMETRO PARTICELLE**			
	< 150 µ	**150-500 µ**	**500- 1000 µ**	**> 1000 µ**
	2	30	43	25
TOTALI CLUB	2,07	39,17	36,74	22,03

Grafico 1: Granulometria sull'intero campione

Graph 1: Granulometric analysis of the whole sample

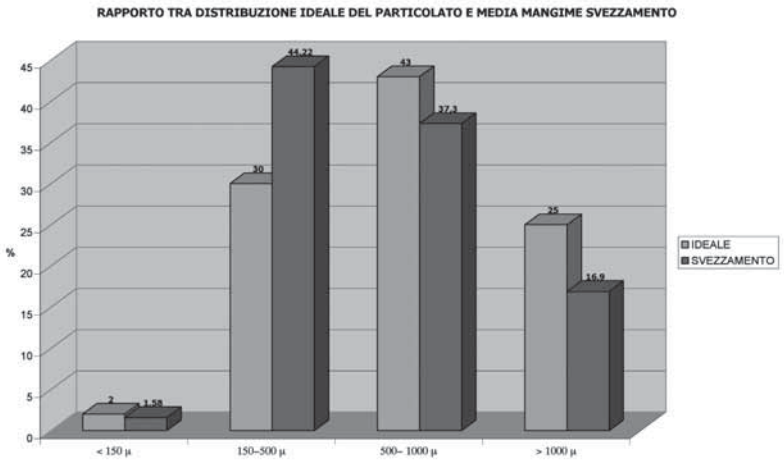


I risultati sui mangimi da svezzamento selezionati dal campione (n=10) sono stati i seguenti:

MANGIME IDEALE	DIAMETRO PARTICELLE			
	< 150 µ	**150-500 µ**	**500- 1000 µ**	**> 1000 µ**
	2	30	43	25
SVEZZAMENTO	1,58	44,22	37,3	16,9

Grafico 2: Granulometrie sui mangimi da svezzamento

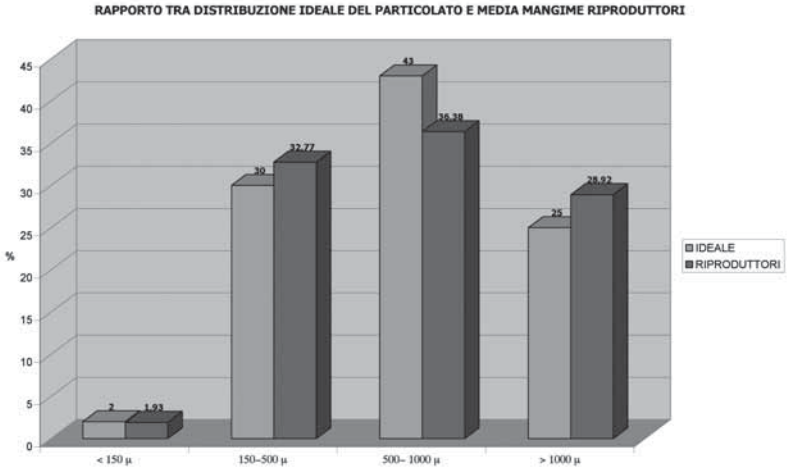
Graph 2: Granulometric analysis of weaning feeds



I risultati sui mangimi per riproduttori selezionati dal campione (n=12) sono stati i seguenti:

MANGIME IDEALE	DIAMETRO PARTICELLE			
	< 150 µ	**150-500 µ**	**500- 1000 µ**	**> 1000 µ**
	2	30	43	25
RIPRODUTTORI	1,93	32,77	36,38	28,92

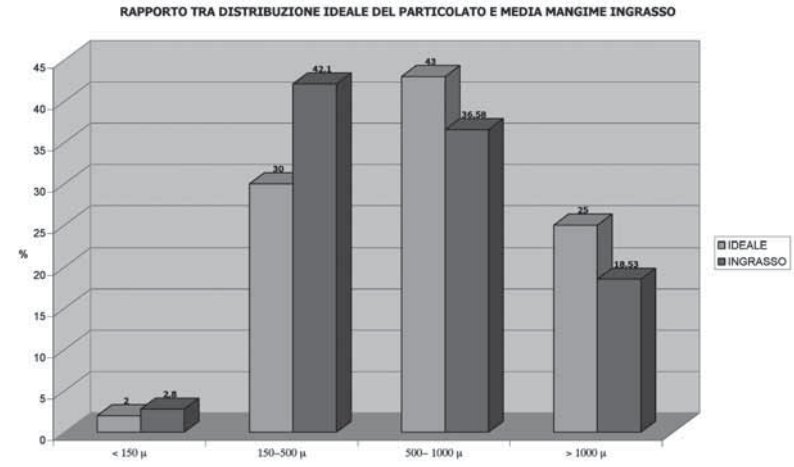
Grafico 3: Granulometrie sui mangimi per riproduttori
Graph 3: Granulometric analysis of breeders feeds



I risultati sui mangimi per ingrasso selezionati dal campione (n=9) sono stati i seguenti:

MANGIME IDEALE	DIAMETRO PARTICELLE			
	< 150 µ	**150-500 µ**	**500- 1000 µ**	**> 1000 µ**
	2	30	43	25
INGRASSO	2,8	42,1	36,58	18,53

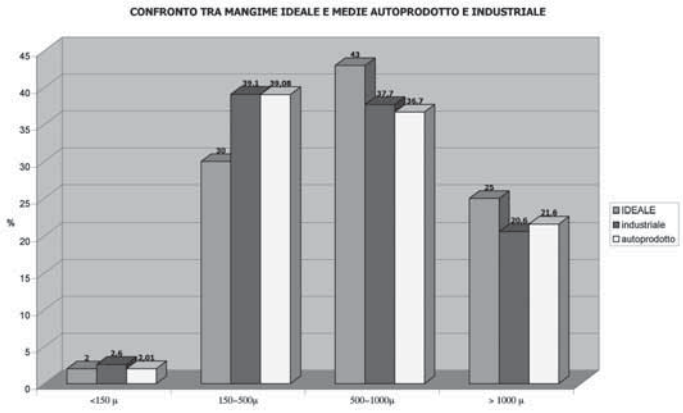
Grafico 4: Granulometrie sui mangimi per ingrasso
Graph 4: Granulometric analysis of fattening feeds



Infine, vengono mostrati i risultati sui mangimi selezionati dal campione in base alla produzione, aziendale (n= 6) oppure industriale (n= 3) :

	diametro particelle			
mangime	**<150 µ**	**150-500 µ**	**500-1000 µ**	**> 1000 µ**
ideale	2	30	43	25
industriale	2,6	39,1	37,7	20,6
autoprodotto	2,01	39,08	36,7	21,6

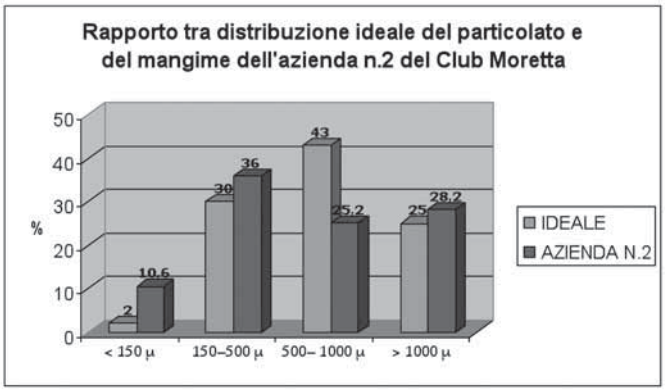
Grafico 5: Granulometrie dei mangimi in base alla produzione
Graph 5: Granulometryc analysis of the feeds depending on production type



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In generale, i mangimi prelevati rispondono abbastanza bene (come valori medi) ai riferimenti pubblicati in bibliografia sulla distribuzione ideale del particolato.
Tuttavia, occorre notare come nella categoria "ingrasso" essi appaiono generalmente macinati un po' più finemente del necessario, con lo scopo evidente di migliorare le prestazioni dell'animale.
Il rischio più probabile che si può mettere in correlazione con detta condizione è quello di trovare qualche difficoltà nella prevenzione per via dietetica della salmonellosi suina (nel caso in cui i controlli evidenziassero una circolazione del patogeno).
Infine, non sono state notate differenze granulometriche evidenti tra i mangimi autoprodotti e i mangimi di tipo industriale.
Tuttavia, le analisi di tipo granulometrico andrebbero eseguite su una base individuale, avendo i valori medi da noi utilizzati un significato di tipo solo tendenziale.
Esaminando i mangimi singolarmente, possono emergere casi con maggiori differenze rispetto alla distribuzione ideale.

A titolo di esempio, un mangime da ingrasso ha presentato il 10,6% di particelle < 150 µ:



In questa situazione, è evidente che un intervento di correzione della tecnologia e delle procedure di macinazione diventa necessario ed urgente, potendosi attendere dalla situazione evidenziata incrementati fattori di rischio, come visto in premessa, sia sullo stato di salute degli animali (ulcere gastriche), che su quello del personale addetto (problemi respiratori da polverosità ambientale), che su quello dei consumatori dei prodotti derivanti da quell'allevamento (incrementata probabilità di rischi legati alla Salmonella).

Bibliografia

- **BARICCO G.** (2008) "Quando le ulcere gastriche sono causate dalla razione." Rivista di Suinicoltura, 7/2008, 54-60.
- **CRENSHAW M.** (2001-02) "Particle Size in Swine Diets: Factors for Consideration". Missisipi State University Extension service of Mississippi State University, cooperating with U.S. Department of Agriculture. Published in furtherance of Acts of Congress, May 8 and June 30, 1914. JOE H. MCGILBERRY, Interim Director (200-1-02).
- **SIMPSON G.** "Pork Production: Is particle size important for swine diets?" Missisipi State University Extension service; (2008) "Particle Size in Swine Diets", Pork News and Views, Dec.2008.
- **MIKKELSEN LL, NAUGHTON PJ, HEDEMANN MS, JENSEN BB** "Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract." Appl Environ Microbiol. 2004 Jun;70(6):3485-92.
- **BARICCO G**. "Approccio zootecnico alla salmonellosi suina" (Zootecnical approach to swine salmonellosis), , Atti del XXIX Corso in Patologia Suina e Tecnica dell'allevamento, Brescia 4 Ottobre-13 Dicembre 2005.
- **MAZZOCCO P, BOTTA G, BARICCO G.** (1997) "Grassatura, melassatura e pellettatura dei mangimi: effetti riscontrati sulla tendenza a produrre polveri inspirabili." Compendio di tecnica e cultura dell'allevamento suino, 1093-1107.

LA SINDROME DELLA PRIMA FIGLIATA

THE FIRST PARITY'S SYNDROME

CASIMIRO TAROCCO

Parole chiave: figli di primipare, peso alla nascita, identificazione permanente, split nursing.

Key words: Gilt's progeny, birth weight, identification, split nursing

Riassunto. L'aumento di perdite sanitarie e la diminuita crescita a carico dei figli delle primipare rispetto alle perdite della progenie delle altre scrofe sono visibili per tutta la loro carriera (effetto che si potrebbe catalogare come sindrome della prima figliata). Le cause sono da attribuire al ridotto trasferimento di anticorpi dalle madri ai neonati e al minor peso medio di tali soggetti alla nascita. Per diminuire le perdite dovute a tale sindrome si suggerisce l'adozione di una metodologia che consenta di identificare in sala parto in tali suinetti l'essere figli di scrofette ed il peso alla nascita onde adottare lo "split nursing" assieme a tutta una serie di altri provvedimenti.

Summary. Data suggest that primiparous progeny experience reduces weaning weights, decreased nursery and finishing average daily gain and greater mortality in the farrowing room, nursery, and in finishing (first parity's syndrome). Basic two are the causes of these problems: a) reduced passive transfer of immunity from dam to the neonate; b) low birth weight.
Because the parity segregation is impossible to apply in our pig farms, my goal is to suggest a system (identification of parity and of birth weight for adoption of split nursing) for reduction of these problems in farrowing room.

INTRODUZIONE

Le performance peggiori sia dal punto di vista sanitario (morbilità e mortalità) che zootecnico (ridotta crescita) dei figli delle primipare (P1) rispetto alla progenie di tutti gli altri parti (P2+) indicano l'esistenza di una sindrome che potrebbe essere definita come "sindrome della prima figliata" (tabella 1).

Tabella 1 – Risultati produttivi della progenie di P1 e P2 +

	Discendenti P1	Discendenti P2 +
Mortalità in svezzamento (%)	2,96	1,52
AMG in svezzamento (g/gg)	430	465
Costo farmaci in svezzamento ($ canad)	1,85	0,72
Mortalità all'ingrasso (%)	1,85	0,72
AMG all'ingrasso (g/gg)	795	820
Costo farmaci all'ingrasso ($ canad)	1,45	1,05)

(da Moore 2005)

Proprio per limitare l'impatto di questa sindrome nelle primipare il veterinario canadese C. Moore ha ideato un metodo (segregazione dei parti) che consiste nell'allevare in una porcilaia separata la rimonta per portarla al parto e lattazione di tali suinetti che proseguiranno fino all'ingrasso in maniera totalmente indipendente dalle figliate delle altre scrofe a numero di parto superiore
Tale metodo ha mantenuto le promesse e oggi un numero sempre più consistente di allevamenti canadesi e statunitensi lo ha adottato.
Nell'impossibilità di adottare il metodo della segregazione dei parti, la presente comunicazione ha lo scopo di illustrare una metodologia che consenta di ridurre le perdite nei figli di primipare nelle aziende suinicole in cui non è possibile separare sia la progenie delle scrofette da quella delle altre scrofe.
Prima di illustrarlo occorre fare alcune

Premesse
I figli delle primipare sono dotati di alcune caratteristiche peculiari per le quali occorre un'attenzione particolare onde limitare i danni che essi incorporano. Infatti i figli di tali scrofe sono caratterizzati da

a) un peso medio inferiore a quello dei figli delle altre scrofe;
b) l'assunzione di un colostro carente di immunoglobuline dal momento che la madre non ha raggiunto ancora la maturità immunologica.

Il primo fattore è facilmente comprensibile visto che la scrofetta ha un utero di dimensioni ridotte. Per il secondo è noto che la quantità di immunoglobuline nella scrofetta è inferiore a quella delle scrofe pluripare ed inoltre che il livello di anticorpi nel colostro varia da scrofetta a scrofetta in rapporto anche al freddo ed ad altri fattori, come ad esempio la variabilità delle differenti mammelle ad erogare IgG. Da tutto questo si desume che tutta la figliata o buona parte di essa riceve un'insufficiente quantità di anticorpi materni che la rende suscettibile alle infezioni nella seconda metà della lattazione ed anche dopo lo svezzamento (Le Dividich et al 2005). Inoltre l'insufficiente immunità umorale influenza negativamente le performance post- svezzamento (Edwards e Rooke 1999).
Voisin et al 2006 hanno accertato che la valutazione della qualità immunologica lascia luogo a sorprese perché se si confronta la correlazione tra il livello di immunoglobuline presente nel siero 4 settimane prima del parto con quello che si evidenzia nel colostro si scopre che tale correlazione è piuttosto debole. I principali fattori che influenzano la qualità immunologica iniziale del colostro sono dati dall'appartenenza dell'animale ad un determinato indirizzo produttivo (più le linee femminili che le maschili) e dal tipo genetico (più nelle scrofe Large White che nelle Pietrain)
Sempre in questa ricerca le scrofette possedevano il 16 % meno di IgG rispetto alle scrofe pluripare.
Comunque un ulteriore elemento evidenziato in una recentissima indagine (Finestra et al 2000) è che la differenza di peso alla nascita facilita lo sviluppo di sottopopolazioni di suinetti con uno stato immunitario differente, a livello minore almeno nella fasi iniziali nei suinetti leggeri e progressivamente maggiore verso i pesanti.
Il minor livello di anticorpi nei figli delle primipare rispetto a quelli di scrofe è evidenziata nella figura 1.

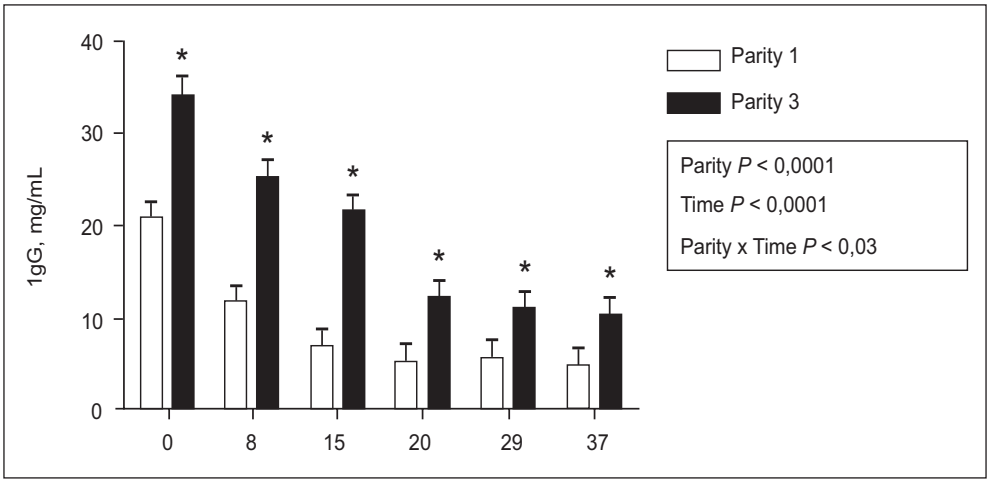


***Figura 1** - Livello di anticorpi IgG circolanti nel siero dei figli di primipare (colonna bianca) rispetto a quelli presenti nei figli di progenie di scrofe di terzo parto (colonna nera) nelle ore 0, 8, 15, 20, 29, 37 dal parto (da Burkey et al 2007)*

Il peso ridotto alla nascita ed il livello anticorpale insufficiente sono tali da determinare in questo sottogruppo un aumento della morbilità, ovvero più patologie rispetto ai figli di pluripare e quindi una percentuale di mortalità superiore a quello dei figli delle scrofe con più alto numero di parto (tabella 2)

Tabella 2 - Media del peso alla nascita e allo svezzamento dei figli delle primipare, secondipare, pluripare (3 – 5 parti) e anziane (parto 6 – 8) in 52 scrofe

	Parti			
	1	**2**	**3-5**	**6 -8**
N° nati totali	**9,5**	9,8	11,8	11,7
N° nati vivi	**9,0**	9,3	10,8	10,1
% nati morti	**5,1**	4,9	7,7	12,3
Peso medio alla nascita (kg)	**1,32**	1,47	1,41	1,39
N° svezzati	**8,4**	9,2	9,9	9,0
Peso allo svezzamento (kg)	**7,71**	9,2	9,9	9,0
% di sopravvivenza	**92,9**	96,8	93,0	89,9

(da Milligan et al 2002)

I problemi di una crescita ridotta si ritrovano non solo in sala parto ma anche dopo lo svezzamento per proseguire nel magronaggio e nell'ingrasso (tabella 3)

Tabella 3 - Confronto della mortalità tra figli di primipare e di pluripare dallo svezzamento a fine ingrasso(da Lowe et al 2005)

	Primipare	Pluripare
Peso allo svezzamento kg	4,5	5,30
Peso a fine ingrasso kg	124,89	127,70
A.M.G. kg	0,697	0,719
Mangime consumato per giorno kg	1,680	1,794
Morbilità e mortalità %	**6,28**	**4,82**

Descrizione del metodo

L'identificazione dei figli di primipare in una sala parto diventa difficile visto il pareggiamento delle figliate che fa seguito all'assunzione del colostro.
Pertanto diventa importante riconoscere in qualsiasi momento della loro carriera produttiva i figli delle primipare dalla progenie degli altri parti sia durante la lattazione sia dopo perché, essendo più suscettibili alle patologie, hanno bisogno di un'attenzione particolare. Pertanto occorre un segno indelebile che secondo un parere personale potrebbe consistere, ad esempio, nell'asportazione della punta del padiglione auricolare sinistro.

Fig. 2 – *Identificazione permanente dei figli di primipare mediante l'asportazione della punta dell'orecchio sinistro.*

Se si considera inoltre che è ormai accertato che i suinetti più pesanti e vivaci assumono maggiormente colostro mentre i leggeri e sottopeso ne ricevono nel medesimo tempo un quantitativo minore, al rischio di un insufficiente assunzione colostrale si può aggiungere anche il peso alla nascita come fattore di rischio che aggrava il primo.
Il peso alla nascita viene normalmente stimato secondo quattro categorie: suinetti pesanti, medi, leggeri e sottopeso (quelli con un peso uguale o inferiore ad 1 kg).
C'è la possibilità quindi con un contrassegno supplementare di riconoscere per tutta la carriera del singolo animale la categoria ponderale di appartenenza e quindi d'interpre-

tare le possibili derivazione zootecniche e sanitarie anche in rapporto a questo parametro (fig. 3). Secondo l'autore di questa memoria sarebbe sufficiente un'incisura in corrispondenza di una ben definita localizzazione sul margine laterale dell'orecchio sinistro per identificare tre categorie di peso presenti alla nascita (sottopeso, leggero e pesante) mentre l'integrità del bordo laterale starebbe ad indicare l'appartenenza dell'animale alla classe più frequente nelle figliate che è quella data dal peso medio del suinetto.
Ne deriva che la maggior parte dei soggetti interessati avrebbe un'unica incisura (figli di primipara) mentre un numero relativo ne riceverebbe due.

Figura 3 – *Incisura sul margine inferiore (per sottopeso), laterale in basso (per leggeri) e laterale in alto (per pesanti) e niente per i medi (che sono i più frequenti) dei figli di una primipara.*

Tale riconoscimento della categoria del peso alla nascita potrebbe essere estesa a tutti i nati in sala parto dal momento che esso rappresenta un fattore strettamente correlato alla successiva crescita e salute.
In una sala parto i figli di primipare assommano a circa il 20 % di tutti i nati con oscillazioni percentuali molto ampie tant'è che non raramente vi sono punte pari o superiori al 40%.
Pertanto se non si prestano le dovute attenzioni le perdite possono essere molto elevate.

Provvedimenti manageriali

A parte tutto quello che può essere fatto durante la crescita della scrofetta e la sua alimentazione durante la gestazione (che dovrebbe essere integrata con Omega 3), la profilassi contro gli inconvenienti di tale sottogruppo di suinetti inizia già dalla collocazione delle scrofette in sala parto.
Una manovra corretta è quella di intercalare le *scrofette* in gabbia parto alle scrofe, anche perché quest'ultime sembrano diminuire la tensione delle nullipare al momento del parto.

Poiché le scrofette hanno una durata di gestazione un po' più lunga delle scrofe in quanto quest'ultime anticipano il parto di 1 – 2 giorni rispetto alle prime, se si ha l'accortezza di intercalare in sala parto le scrofette coperte qualche giorno prima delle scrofe vi sono molte probabilità che gli animali contigui partoriscano contemporaneamente. L'anticipo della copertura delle scrofette rispetto alle scrofe può essere programmato mediante l'applicazione dell'altrenogest.
Una seconda manovra potrebbe essere quella di effettuare un parto programmato tramite prostaglandine alle scrofe coperte più tardi delle scrofette per ottenere nel più alto numero dei casi la contemporaneità dei parti tra scrofe e scrofette.
Lo scopo di questo intervento è quello di permettere lo "split nursing". Tale metodo consiste, una volta che i suinetti neonati della scrofa hanno tutti poppato per alcune ore, nel rinchiuderli nel nido riscaldato o in una cassetta mentre si trasferisce l'intera figliata della primipara alla scrofa vicina. Ci si accerta che tutti i trasferiti poppino per due o tre ore – magari aiutando quel suinetto che ha difficoltà a prendere il capezzolo - dopo di che si ritrasferisce la figliata alla propria madre mentre la covata della scrofa viene liberata in modo che tutti riprendano il poppamento.
Tale manovra potrebbe essere ripetuta nel corso della medesima giornata.
E' naturale che un simile intervento ha più probabilità di successo se le scrofe intercalate alle scrofette hanno capezzoli sottili, quindi facilmente afferrabili anche dalla bocca dei suinetti sottopeso, come ad esempio si vedono in scrofe di secondo parto.

I risultati di questo metodo sono presentati nella tabella 4.

Tabella 4 – Numero di suinetti in un gruppo di 1000 capi che pesavano meno allo svezzamento precocissimo ad un determinato peso tra coloro che avevano ricevuto lo split nursing (cioè scambiati alla nascita per 2 ore con una scrofa) e quelli nutriti dalla loro madre (controllo).

Peso allo svezzamento (kg)	Controllo	Split nursing	Deviazione di kg 0,25 per il 68 % dei suinetti
2,7	2	0	1
3,2	9	2	4
3,6	31	12	16
4,0	83	47	48
4,5	182	132	117
5,0	333	288	238

(da Tokach et al 1998)

Provvedimenti immunitari per i suinetti

Oltre alla manovra anzidetta (split nursing), un secondo provvedimento potrebbe essere quello di somministrare ai suinetti inappetenti il colostro munto in precedenza da scrofe pluripare con ottima portata lattea.
In assenza di colostro di scrofa si potrebbe utilizzare quello di vacca (Kirkwood 1998, Hahn 2007).

Misure indirette per sviluppare un miglioramento del livello immunitario nel suinetto.

Tali misure secondo Hurley (2004) sarebbero le seguenti:

a) *lo stato di nutrizione della scrofa al parto* che dovrebbe essere quello corretto. Infatti l'integrazione della razione della scrofa con omega – 3, il miglior rapporto tra muscolo e grasso nella scrofa oltre ad una adeguata quantità di vitamine e di sali minerali presuppongono che il colostro ed il latte forniranno ai suinetti le calorie, le proteine e i grassi necessari per un buon sviluppo del sistema immunitario ed un ridotto livello per le risposte infiammatorie;
b) *il piano vaccinale.* La vaccinazione della scrofa e a tempo debito dei suinetti provvede un'adeguata protezione contro le patologie diarroiche associate ad una larga parte della mortalità neonatale;
c) *la composizione degli acidi grassi nella dieta.* Somministrando oltre che in gestazione anche fin dal primo giorno di lattazione nella dieta della primipara degli omega 3 si è visto che essi ottimizzano la risposta infiammatoria mentre migliorano le capacità adattative dell'intestino;
d) *dotare i suinetti di un ambiente pulito, con alto livello di biosicurezza*. L'esposizione a malattie tipo PRRS e circovirus si è dimostrata avere un impatto negativo importante sullo sviluppo dell'immunità neonatale;
e) *sistemare i suinetti in un ambiente confortevole per temperatura e densità*. Poiché i suinetti sono sensibili allo stress termico ed all'affollamento, una maggior attenzione a questi fattori al trasferimento in svezzamento e magronaggio comporta una migliore resistenza all'esposizione dei patogeni;
f) *controllare l'introduzione di alimenti con caratteristiche antigeniche*. L'esposizione ad antigeni alimentari può avere un effetto significativo sullo sviluppo immunitario con lo sviluppo di "allergie alimentari".

Profilassi medicamentosa

Certamente occorre proteggere il suinetto dalle possibili infezioni fin dalla nascita. Poiché in questi suinetti è carente la difesa immunitaria bisogna ricorrere ad una profilassi con antibiotici.
C'è chi ha puntato sui probiotici (Castillo 2007) ed ha visto che i probiotici alimentano i lattobacilli e bifidi nei suinetti riducendo il potere patogeno dei Coli.

Provvedimenti per migliorare il peso durante la lattazione

Il pareggiamento consiste nello scambio dei suinetti delle varie figliate tra le scrofe presenti in sala parto per dare ad ogni femmina allattante un gruppo di nati che siano omogenei per peso. Infatti si affidano alle primipare che hanno appena partorito i suinetti più leggeri (i sottopeso).
Occorre ricordare che il livello anticorpale in un suinetto di peso normale è raggiunto quando ha assunto circa 200 g di colostro, cosa che avviene nelle prime 12 ore. Per un suinetto leggero o sottopeso tale livello avviene dopo 24 ore il che indica che il pareggiamento dovrebbe essere effettuato a tempi differenziati in rapporto al peso di nascita.
Vi sono altri fattori che incidono sulla crescita.
Infatti sembra che non sia indifferente il sesso dei poppanti per la crescita successiva.

Secondo l'esperienza di Larriestra et al (2002) se questi sottopeso sono di sesso femminile alla fine del postsvezzamento questi soggetti avrebbero una probabilità di crescita di circa 5 volte minore rispetto a quella dei fratelli maschi castrati che invece sono stati allattati da una scrofa.
Le scadenti performance (crescita e sopravvivenza) dei figli delle primipare sono dovute anche al basso peso alla nascita (tabella 5)

Tabella 5 – Numero di suinetti, peso medio alla nascita (kg) e percentuale di sopravvivenza in suinetti classificati alla nascita come leggeri e pesanti in rapporto al numero di parto della madre.

	Suinetti valutati come leggeri				Suinetti valutati come pesanti			
N° parto	Numero	Peso m. nascita	Peso m. svezz.	Sopravv. %	Numero	Peso m. nascita	Peso m. svezz.	Sopravv. %
1	**28**	**0,91**	**6,02**	**75**	**136**	**1,36**	**7,99**	**89,7**
2	38	0,95	6,39	84,2	158	1,50	8,28	97,5
3-5	160	1,00	6,42	78,2	597	1,49	8,03	94,5
6 - 8	170	0,96	6,64	68,8	702	1,46	8,17	93,6
Totale	396	0,97	6,39	74,5	1593	1,47	8,04	94

(da Milligan et al 2002)

La relazione esistente tra peso allo svezzamento e crescita successiva è dimostrato dalla tabella 6.

Tabella 6 – Differenti pesi allo svezzamento e a 40 giorni paragonati anche in rapporto al costo del mangime

	Classi di peso			
	A	**B**	**C**	**D**
Peso allo svezzamento kg	5,2	6,6	7,4	8,4
Peso a 40 giorni kg	21,7	24,7	25,2	27,6
Consumo di mangime/kg di crescita	1,38	1,42	1,45	1,43
A.M.G. g	415	454	445	479
Costo del mangime/suinetto in confronto a D €	+ 4,04	+1,57	+ 0,77	0

(da Sus 2008)

Che i risultati delle performance dopo lo svezzamento dei figli delle primipare non siano pari a quelli che ottengono i discendenti delle multipare sono evidenziati anche nella ricerca di Pineiro et al (tabella 7).

Tabella 7 – Accrescimento medio giornaliero (g/giorno), quantità di mangime ingerito (g/giorno) e indice di conversione in 200 suinetti figli di primipare e pluripare tra i 28 e i 60 giorni d'età (Pineiro et al)

	A. M. G. (g)	Mangime ingerito (g)	I. C.
Figli di primipare	391	453	1,17
Figli di multipare	456	500	1,09
	***	*	*

* = P < 0,05 *** = P < 0,001

Sempre nella medesima ricerca si sono osservati gli interventi terapeutici e la mortalità tra i due gruppi di suini (tabella 8)

Tabella 8 – Interventi terapeutici e mortalità tra figli di primipare e di pluripare

	Figli di primipare	Figli di multipare
Mortalità (%)	4,89	2,41
Interventi terapeutici (%)	17,0	6,0

I risultati della somministrazione di mangime medicato nei confronti del non medicato dimostrano che l'apporto di antibiotici ha un potenziale importante per la stabilizzazione dell'ingestione del mangime e per ridurre la mortalità in postsvezzamento (Tabella 9)

Tabella 9 - Effetto del numero di parto e della somministrazione profilattica di antibiotico sulle performance di crescita dallo svezzamento a fine ingrasso (da Lowe et al 2005)

	Figli di primipare	Figli di multipare	Mangime con antibiotico	Mangime senza antibiotico
Peso iniziale (kg)	4,5	5,10	4,94	4,94
Peso finale kg	124,89	127,30	126,20	125,9
A.M.G. Kg	0,67	0,71	0,70	0,70
Mangime per giorno (kg)	1,68	1,794	1,75	1,74
Morbilità e mortalità	6,28	4,82	4,63	6,94

CONCLUSIONE

Se il sesso dei poppanti, il numero di parto della madre, il peso alla nascita e allo svezzamento sono fattori che incidono fondamentalmente sullo stato di salute oltre che sulla crescita successiva allo svezzamento, allora occorre integrare il metodo proposto con nuove ricerche.

Bibliografia

Boudry C., Buldgen A., Dehoux JP. – Effects of oral supplementation with bovine colostrum on the immunity of weaned piglets – Proc. IPVS 2006, p. 300.

Burkey TE., Miller PS., Johnson RK., Reese DE:, Moreno R. (2008) – Does dam parity affect progeny health status? – Nebraska Swine Report , p 33

Castillo M. (2007) – Do feeds affect immunity? – Pig Int. 37 , (10) , 10

Edwards S.A. e Rooke J.A. (1999) cit. da Le Dividich et al.:

Finestra A., Cos R., Bruguera S., Riera P., Llopart D. – Influence of body weight at birth from hiperprolific sows on the absorp of maternal derived immunity - Proc. IPVS 2006, p. 301

Hahn J. (2007)- Utilization of a bovine colostrum extract product to improve the survivability and pre-weaning weight gain in low birth weight piglets. Am. Ass. Swine Vet. , 333

Hurly D.J. (2004) – Neonatal immune development in swine management (2004) – Amer. Assoc. Swine Vet, p. 389

Lowe FJ., Wolter BE, Bertelsen C., Johnson EE (2005) – What we have learned about grow – finish performance: Understanding the role of management in optimizing performance of growing pigs – Amer. Ass. Swine Vet., p 447

Kirkwood J. (1998) – Reproductive management of pigs – Sus – Multimedia

Larriestra AJ., Wattanaphansak S., Neumann E., Bradford J., Morrison R. J. (2002 – Pre-existing conditions as predictors of mortality and slow growth in nursery pigs. – Allen D. Leman Swine Conference, p . 231

Le Dividich J., Rooke J.A. , Herpin P. (2005) – Nutritional ad immunological importance of colostrum for the new-born pig – Journ. Agricultural Science, 143, 469

Lowe JF., Wolter BE., Peterson B., Bertelsen C., Johonson EE., Bowman R. (2005)- Understanding the role of management in optimizing performance of growing pigs – Amer Assoc. Swine Vet , 2005, 447

Miller YJ., Holyaoke P., Collins A., Smith R. - Improving the performance of gilt progeny – Proceed. IPVS 2006, 106

Milligan BN:, Fraser D., Kramer DL. (2002) – Wi – litter weight variation in the domestic pig and its relation to pre- wing survival, weight gain and variation in weaning weights – Livestock Production Science 76, 181.

Moore C. (2001) – Segregated production: How far could we go? – Allen Leman Swine Conf. , p 203

Moore C. (2005) – Parity segregation – London Swine Conf. , 61

Pineiro C., Pineiro M., Morales J., Manteca X., Mateos GG. (Comparaciòn dela productividad de la progenie de cerdas primerizas con la de cerdas multìparas - Estratto

Smith AL., Stalder KJ., Serenius TV., Baas TJ., Mabry JW. (2007) – Effect of piglet birth weight on weights at weaning an 42 days post weanig – J. Swine Health Prod. , 15 (4), 213.

Tarocco C. (1998) – Performance riproduttive e produttive delle scrofette all'ingrasso macellate dopo il primo parto (ricerca preliminare) – Suinicoltura ricerca – (5), 65.

Tokach MD., Dritz SS., Goodband RD., Nelssen JL. (1998) – Managing variation on the way in : Weaning weight – Allen L Swine Conference , 120

Voisin F., Le Dividich J., Salle E., Martineau GP. (2006) On-assessment of the immune quality of sow colostrum - Proceed. IPVS, 299

APPLICAZIONE DI UN "RATING SCALE" COMPORTAMENTALE E ASSOCIAZIONE CON IL SOVRAFFOLLAMENTO NELL'ALLEVAMENTO SUINO INTENSIVO: RISULTATI PRELIMINARI.

BEHAVIOUR RATING SCALE AND ASSOCIATION WITH OVERCROWDING IN THE INTENSIVE SWINE FARM: PRELIMINARY RESULTS.

TARANTOLA M.*, TOMASSONE L.*, FERENAZ I.*, MARTANO G **

**Dipartimento Di Produzioni Animali, Epidemiologia Ed Ecologia. Università Degli Studi Di Torino.*
***Veterinario Dirigente Asl 10; Piemonte*

Parole chiave: benessere, suino, anomalie comportamentali, rating scale comportamentale.

Key words: welfare, pig, abnormal behaviour, behavioural rating scale.

Riassunto. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il benessere dei suini in allevamento intensivo utilizzando un punteggio (*Global Score*), secondo il metodo proposto da Candotti et al (2007), e verificarne l'associazione con il sovraffollamento in azienda. Sono stati testati gruppi di suini presenti in 33 allevamenti situati nelle province di Torino e Cuneo, di cui 9 da riproduzione e 24 da ingrasso; il campione è stato ulteriormente diviso in: A) suini allo svezzamento (28-55 giorni di vita) e B) in fase di magronaggio (55-120 giorni di vita). E' stata utilizzata una scheda contenente *item* riguardanti alcune anomalie comportamentali tipiche del suino e la presenza di lesioni. Per ogni i*tem* è stata registrata la frequenza e la prevalenza sul totale degli allevamenti e l'associazione con il sovraffollamento di animali. Nel campione A, l'eterolesionismo risulta significativamente più frequente negli allevamenti caratterizzati da sovraffollamento ($p<0.05$; Fisher Exact Test), mentre nel campione B nessun *item* è risultato essere significativamente associato a tale parametro. In entrambi i campioni analizzati, il Global Score era significativamente più alto negli allevamenti non caratterizzati da sovraffollamento (t test; gruppo A: $p<0.01$, gruppo B: $p<0.001$). Questi dati costituiscono i risultati preliminari di uno studio che mira a valutare alcuni parametri riguardanti il benessere dei suini allevati, utilizzando le check-list relative alla normativa 2001/93/CEE (strutturazione interna degli edifici, microclima, management alimentare, mutilazioni, formazione del personale).

Summary. The aim of this study was to evaluate the pig welfare using a Global Score and a behaviour test, according to the method proposed by Candotti *et* al (2007) and verify its association with overcrowding. We tested 33 breeding units within two Provinces (Turin and Cuneo) 9 farrow to breed herds and 24 fattening herds. The sample was further divided into: A) weaning piglets (28-55 days old) and B) pigs (55-120 days of life). A form containing specific items related to typical abnormal behaviour and presence of injuries was used. For each item, the frequency, the prevalence and association with overcrowding, was recorded. In sample A, injuries against other pigs are significantly more frequent in farms with overcrowding ($p<0.05$; Fisher Exact Test). In sample B,

none of the items was found to be significantly associated with this parameter.
In both samples analyzed, the global score was found to be significantly higher in farms with no overcrowding (t test; group A: $p<0.01$, group B: $p<0.001$). These data are the preliminary results of a study designed to assess some parameters related to the welfare of reared pigs, using a check list based on the 2001/93/CE legislation (structure of buildings, microclimate, food management, injures, staff training).

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni sono stati studiati e sviluppati diversi sistemi per la valutazione del benessere animale. La comunità scientifica europea ha spesso dibattuto sulla possibilità di individuare una univoca definizione di benessere animale, nonché sull'importanza della tutela degli animali allevati. Lo dimostra l'emanazione di normative che sanciscono che la salvaguardia del benessere animale riveste un ruolo rilevante sia sul piano etico che sul piano produttivo-sanitario, nonché per la sicurezza alimentare. Anche l'opinione pubblica, d'altronde, manifesta sempre più attenzione verso le problematiche degli allevamenti intensivi.
Sono diversi gli approcci scientifici che mirano ad oggettivare lo studio di questo tema, fra questi l'osservazione dell'animale e delle sue risposte agli stimoli e alle variazioni dell'ambiente sicuramente riveste un ruolo fondamentale (Smulders. *et al.* 2006). Rispetto ad altri parametri indicatori di benessere, quali ad esempio i parametri fisiologici, la verifica di anomalie comportamentali può essere facilmente riconoscibile anche dall'allevatore o, come illustra in una suo lavoro F. Wemelsfelder (Wemelsfelder *et al.* 2000), da osservatori inesperti. Lo studio del comportamento, inoltre, non è invasivo.
L'allevamento suinicolo intensivo presenta diversi punti critici in grado di ridurre il benessere degli animali: il microclima, il management alimentare, le mutilazioni, la formazione del personale, la strutturazione interna degli edifici, gli aspetti sociali. Gli animali allevati possono essere sottoposti a stressors per tutta la loro carriera produttiva, manifestando anomalie comportamentali indice, quindi, di difficoltà ad adattarsi all'ambiente che li ospita (per utilizzare la classica definizione di benessere di Broom DM: "*The welfare of an animal is its state as regards its attempts to cope with its environment*", 1986).
Diverse anomalie comportamentali sono ormai riconosciute essere indicatori di stress, così come la presenza di lesioni (Faucitano *et al.*, 2008; Velarde *et al*, 2007). Con questo lavoro, quindi, si è voluto indagare quanto queste fossero diffuse in un campione di allevamenti suinicoli intensivi e la loro associazione con il sovraffollamento. Utilizzando uno strumento messo a punto da Candotti *et al* (2007), che assegna un punteggio ad ogni *item* riguardante il benessere animale, è stato possibile, quindi, attribuire un *Global Score* agli allevamenti oggetto di studio.

MATERIALI E METODI

Il lavoro ha riguardato 33 allevamenti, di cui 9 da riproduzione e 24 da ingrasso.
Il campione da testare è stata diviso in: A) suini allo svezzamento (28-55 giorni di vita) e B) suini in fase di magronaggio (55-120 giorni di vita). Il campione A era rappresentato da suini allevati in un gruppo di 20-25 animali, presenti in 9 allevamenti; il campione B

da suini allevati in un gruppo di 10-15 animali, presenti in 29 allevamenti.
E' stata utilizzata una scheda di rilevazione comportamentale per il suino, in cui è stato assegnato un punteggio ad ogni item, proposta da Candotti *et al* (2007). Ogni scheda è stata utilizzata per ogni singolo gruppo. Inoltre, gli operatori valutavano se l'allevamento fosse caratterizzato da sovraffollamento.
La compilazione della scheda è stata eseguita sempre nelle ore diurne dagli stessi operatori, con le stesse modalità operative. Dopo aver individuato un gruppo di suini ed avere atteso qualche minuto che si tranquillizzassero e perdessero interesse verso l'operatore si è proceduto alla osservazione dei comportamenti e delle eventuali lesioni per un periodo minimo di quindici minuti.
La scheda compilata per il campione A era composta da 10 *item* (tabella 1).

Tabella 1: ***scheda di rilevazione comportamentale per suini allo svezzamento (28-55 giorni di vita)***

	Osservato	Non osservato
Ci sono gruppi di suinetti ammassati ?	0	1,490
E' presente bell noising ?	0	0,922
E' presente ear biting ?	0	1,243
E' presente tail biting ?	0	1,504
I suini presentano atteggiamenti competitivi ?	0	1,353
Eterolesionismo ?	0	1,679
Lesioni alle orecchie ?	0	1,714
Lesioni alla coda ?	0	1,394
Lesioni alla parte anteriore ?	0	1,435
Lesioni alla parte posteriore ?	0	2,011

Il valore ottenuto quindi poteva variare da 14,745 (massimo benessere) a 0 (minimo benessere).
La scheda compilata per il campione B era composta da 7 *item* (tabella 2).

Tabella 2: ***scheda di rilevazione comportamentale per suini in fase di magronaggio (da 55 a 120 giorni)***

	Osservato	Non osservato
I suini sono aggressivi ?	0	0,916
E' presente bell noising ?	0	1,169
I suini presentano atteggiamenti competitivi ?	0	1,333
E' presente ear biting ?	0	1,529
E' presente tail biting ?	0	1,159
E' presente morsicatura delle barre/strutture ?	0	1,481
Sono presenti lesioni alle orecchie ?	0	1,320

Il valore ottenuto poteva quindi variare da 8,907 (massimo benessere) a 0 (minimo benessere).
Per ogni *item* è stata registrata la frequenza e la prevalenza sul totale degli allevamenti

con intervalli di confidenza al 95% (95% CI; tabella 3 e 4) e l'associazione con il sovraffollamento di animali (Fisher Exact Test). Per stabilire se la superficie libera a disposizione di ciascun suino fosse congrua si è tenuto conto di quanto disposto dal DL 20 febbraio 2004, n°53; "Attuazione della direttiva n. 2001/93/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini" che impartisce le misure minime delle superfici libere a disposizione per ciascun suinetto.
Si è proceduto quindi alla verifica dell'associazione tra il punteggio totale relativo al benessere e il sovraffollamento (test t di Student).
Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software R (R Development Core Team, 2007).

RISULTATI

Per il campione di suini allo svezzamento, su 9 allevamenti 3 presentavano sovraffollamento (33.3%, 95% CI: 7.5-70.1); in tabella 3 sono riportati la frequenza con cui sono stati registrati i vari comportamenti e la loro prevalenza sul totale degli allevamenti.
Analizzando l'associazione tra la sovraffollamento di animali e gli *item*, l'eterolesionismo risulta significativamente più frequente negli allevamenti caratterizzati da eccessiva densità ($p<0.05$; Fisher Exact Test), mentre per gli altri *item* non si rilevano associazioni significative.
Il punteggio relativo al benessere ha un valore medio pari a 8.11 in questo gruppo (deviazione standard: 2.96), con un minimo di 4.4 ed un massimo di 13.4. Questo score è risultato essere significativamente più alto negli allevamenti caratterizzati da densità adeguata (t test, $p<0.01$), dove era pari a 9.81 contro un punteggio medio di 4.70 negli allevamenti sovraffollati.
Per il campione di suini in fase di magronaggio, su 29 allevamenti 9 presentavano sovraffollamento (31.0%, 95% CI: 15.3-50.8). In tabella 4 sono riportati la frequenza con cui sono stati registrati i vari comportamenti e la loro prevalenza sul totale degli allevamenti.
Nessun item è risultato essere significativamente associato al sovraffollamento.
Il punteggio medio relativo al benessere è pari a 3.80 in questo gruppo (deviazione standard: 1.6), con un minimo di 1.3 ed un massimo di 7.7. Anche in questo gruppo, lo score è risultato essere significativamente più alto negli allevamenti non caratterizzati da sovraffollamento (t test, $p<0.001$), con una media di 4.49 contro 2.7 degli allevamenti con alta densità di animali.
Le anomalie comportamentali maggiormente riscontrate in entrambi i gruppi, quali "*ear biting*" (per il gruppo A nel 78% degli allevamenti per il gruppo B nel 93 %) e "*tail biting*" (gruppo A: 67%, gruppo B: 59 %) così come le lesioni alle orecchie (gruppo A: 78%, gruppo B: 76 %) e alla coda (gruppo A: 67%), sono riconosciute come alcune delle maggiori problematiche nell'allevamento suino (Anon. 1997; *Schrøder et al* 2001), in quanto riducono lo stato di benessere e possono essere causa di cannibalismo. Sono indicatori di malessere, sofferenza (possono esserci casi di ascessi spinali), frustrazione (o "understimolation") dovuta al mancato grufolamento e/o esplorazione (ad esempio per assenza o carenza di paglia, Anon. 2007). Nel gruppo dei suini in fase di magronaggio anche gli atteggiamenti competitivi sono frequenti (55% degli allevamenti), questo può essere dovuto alla carenza di spazio. La morsicatura delle sbarre, tipica stereotipia, presente nel 52% degli allevamenti (gruppo B) sembra essere dovuta a carenze alimentari o di spazio.

Tabella 3: ***frequenza e prevalenza degli item (con intervalli di confidenza), nel campione A (suini allo svezzamento)***

	si	% (95%CI)
Ci sono gruppi di suinetti ammassati ?	4	44.4 (13.7-78.8)
E' presente bell noising ?	4	44.4 (13.7-78.8)
E' presente ear biting ?	7	77.8 (40.0-97.2)
E' presente tail biting ?	6	66.7 (29.9-92.5)
I suini presentano atteggiamenti competitivi ?	3	33.3 (7.5-70.1)
Eterolesionismo ?	4	44.4 (13.7-78.8)
Lesioni alle orecchie ?	7	77.8 (40.0-97.2)
Lesioni alla coda ?	6	66.7 (29.9-92.5)
Lesioni alla parte anteriore ?	0	0 (0-33.6)
Lesioni alla parte posteriore ?	0	0 (0-33.6)

Tabella 4: ***frequenza e prevalenza degli item (con intervalli di confidenza), nel campione A (suini allo svezzamento*)**

	sì	% (95%CI)
I suini sono aggressivi ?	7	24.1 (10.3-43.5)
E' presente bell noising ?	7	24.1 (10.3-43.5)
I suini presentano atteggiamenti competitivi ?	16	55.2 (35.7-73.6)
E' presente ear biting ?	27	93.1 (77.2-99.1)
E' presente tail biting ?	17	58.6 (38.9-76.5)
E' presente morsicatura delle barre/strutture ?	15	51.7 (32.5-70.6)
Lesioni alle orecchie ?	22	75.8 (56.5-89.7)

DISCUSSIONE

La presenza di un'alta percentuale di anomalie comportamentali è un indice di scarso benessere, le cause sono multifattoriali ma la carenza di spazio sembra essere una della cause predominanti. L'associazione tra uno scarso benessere, misurato come "*Global Score*", e il sovraffollamento, come risulta dal nostro lavoro, sottolinea ulteriormente l'importanza per questa specie animale di adeguati spazi.
Lo *scaling* proposto da Candotti *et al.* (2007) può essere considerato uno strumento utile, oggettivo e di agevole applicazione per valutare il benessere dei suini. Tuttavia, il limitato numero di osservazioni utilizzato per costruire la scala può rappresentare un elemento critico e sarebbe utile validare tale metodo su un campione più ampio di animali.

CONCLUSIONI

Valutare il benessere animale necessita sicuramente di un approccio multidisciplinare, lo studio del comportamento è in grado di dare un utile apporto alla conoscenza dello stato psico-fisico in cui si trova l'animale allevato.
Questo lavoro rappresenta una fase preliminare. L'integrazione di questi risultati con

altri parametri relativi agli animali (fisiologici, produttivi) e all'ambiente d'allevamento e alla sua gestione, permetteranno di valutare in maniera oggettiva lo stato di benessere. Se i dati confermeranno una situazione di diffuso malessere negli allevamenti studiati, l'applicazione del DL n. 53 del 2004 (a decorrere dal 2013 per tutte le aziende), che impone anche spazi adeguati, permetterà di migliorare l'ambiente di allevamento, e quindi garantire maggior benessere ai suini allevati.

Bibliografia

Anon. Scientific veterinary committee. (1997). The welfare of intensively kept pigs. Doc. XXIV/ScVc/0005/97.

Anon. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare.The EFSA Journal. (2007). Pig welfare risks associated with tail biting.

Broom DM. (1986). Indicators of poor welfare. Br Vet J;142:524–6.

Candotti P., Rota Nodari S.,Tranquillo M., Mattiello S. ,Verga M. (2007). Un nuovo approccio alla misurazione del benessere dei suini allo svezzamento: il rating scale comportamentale. Risultati preliminari. "Atti XXXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini". Modena 29-30 marzo 2007, 317-325.

Faucitano L., Schaefer A. L. (2008). Welfare of Pigs From Birth to Slaughter. Wageningen Academic Publishers

R Development Core Team (2007). R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria, http://www.R-project.org.

Schrøder-Peterson DL, Simonsen HB. (2001). Tail biting in pigs. Vet J;162:196–210.

Smulders D., Verbeke G, Mormede P., Geers R. (2006). Validation of a behavioural observation tool to assess pig welfare. Physiology & Behavior 89. 438–447

Velarde A. and Geers R. (2007). On farm monitoring of pig welfare. Wageningen Academic Publishers pp 207

Wemelsfelder F., Hunter E.A., Mendl M.T., Lawrence A.B. (2000). The spontaneous qualitative assessment of behavioural expressions in pigs: first explorations of a novel methodology for integrative animal welfare measurement. Applied Animal Behaviour Science 67.193–215

Attenzione: Lawsonia si mangia il Suo mangime

(da 14 a 36 kg di mangime in più fino a 110 kg di peso vivo)

Anche una bassa infezione da Lawsonia aumenta il consumo di mangime.

Elanco Animal Health
Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)

Raggiungi il Pieno Valore con Elanco.

ELANCO™

Tel. 055 4257031 - Fax 055 4257068
www.elanco.com

VERIFICA DEGLI EFFETTI FLOGISTICI DELLO SVEZZAMENTO PRECOCE NEL SUINETTO E LORO MODULAZIONE MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE DI INTERFERON-ALFA

ASSESSMENT OF THE INFLAMMATORY RESPONSE TO EARLY WEANING IN PIGLETS: IMPACT OF AN ORAL INTERFERON-ALPHA TREATMENT

P. CANDOTTI, S. ROTA NODARI, E. RAZZUOLI, S. DOTTI, M. AMADORI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" Sede di Brescia

Parole chiave: suino, svezzamento, interferon-α, citochine.

Key words: pig, weaning, interferon-α, cytokines.

Riassunto. Lo scopo di questo studio è stato di valutare in suinetti di campo gli effetti di due diverse date di svezzamento (22 e 28 giorni di vita) mediante la valutazione di alcuni parametri immunologici (IFN-α, TNF–α, IL-6) e della capacità di accrescimento. E' stato inoltre valutato il possibile effetto di modulazione da parte di IFN-α somministrato a basso dosaggio *per os*. La prova è stata condotta su 59 suinetti, divisi in tre gruppi, il primo svezzato a 28 giorni, il secondo a 22 ed il terzo gruppo sempre a 22 e sottoposto a trattamento con IFN-α. I dati ottenuti indicano che la somministrazione di questa citochina svolge un effetto positivo sulla modulazione del circuito delle citochine infiammatorie, migliorando la capacità di risposta omeostatica allo stress scatenato dallo svezzamento precoce.

Summary. *Weaning of piglets at 22 and 28 days was investigated in terms of cytokine response (IFN-α, TNF–α, IL-6) and growth parameters. The effects of an oral, low-dose IFN-α treatment at weaning were evaluated as well. The trial was carried out on 59 piglets of the same farm, allocated to three groups: the first and the second groups were weaned at 28 and 22 days, respectively; the third one was weaned at 22 days and treated with IFN-α. Results indicate that IFN-α can effectively modulate the circuits of the inflammatory cytokine response, thus improving the homeostatic response to the early weaning stressor.*

INTRODUZIONE

Lo svezzamento dei suinetti è uno dei momenti più critici dell'intero ciclo dell'allevamento suino. Vi sono infatti numerosi fattori che possono determinare problemi più o meno gravi agli animali nel momento dell'allontanamento dalla madre (cambiamento dell'alimentazione, immaturità dell'epitelio intestinale, rimescolamento delle nidiate, variazioni nella temperatura e nell'umidità dei capannoni, ecc). In questo scenario, nella letteratura scientifica sono stati approfonditi i legami funzionali tra risposta immunitaria innata, flogosi e stress; proprio la risposta flogistica viene considerata come un meccanismo di primaria importanza per i processi omeostatici dell'ospite nei confronti degli

stressors, sia di origine infettiva che non infettiva (Amadori M., 2007).
Lo svezzamento precoce dei suinetti è sicuramente una pratica di allevamento che gioca un ruolo fondamentale nell'insorgenza di *stress* negli animali; infatti, a tre settimane di vita il sistema immunitario del suino e la mucosa intestinale non sono ancora completamente maturi; quindi, un'esposizione precoce agli antigeni della dieta *starter* può determinare un'alterazione del corretto assorbimento dei nutrienti e degli elettroliti, con conseguenze negative sia sullo stato immunitario locale sia sulla microflora intestinale (Barnett K.L. *et al.* 1989, Nabuurs M.J.A. *et al.* 1993). L'età dei soggetti è di particolare importanza al fine di minimizzare le possibili perdite che si verificano in questo momento. L'associazione di varie componenti di stress fisico, nutrizionale, immunologico ed emozionale è fra i motivi che hanno spinto il Legislatore ad indicare il termine dei 28 giorni come quello indicato per lo svezzamento dei suinetti (D.Lgs. 20/02/2004 n° 53).
Vi sono indicazioni che lo svezzamento precoce determina una cospicua risposta omeostatica compensativa, la quale si evidenzia con la comparsa di interferon-α (IFN–α) nel siero degli animali nei giorni successivi allo svezzamento (Amadori M., 2007).
Sulla base di precedenti risultati ottenuti mediante la valutazione di un modello suino SPF, è stato evidenziato come l'IFN-α, *Tumor Necrosis Factor*-α (TNF-α) ed Interleuchina-6 (IL-6) sierici giochino un ruolo importante nella risposta omeostatica ad eventi stressanti di varia natura e come la somministrazione di IFN-α *per os* possa sostituire in parte il fabbisogno di tale risposta endogena (Amadori M., 2007). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di focalizzare l'attenzione alla pratica dell'allevamento intensivo, al fine di acquisire ulteriori dati sulla risposta flogistica allo svezzamento precoce, nonché di valutare il possibile effetto di modulazione da parte di IFN-α somministrato a basso dosaggio *per os*.

MATERIALI E METODI

1.1. Animali
In un allevamento di suini a ciclo chiuso sono state individuate in forma random sei nidiate di suinetti per un totale di 59 animali aventi tutti la medesima componente genetica, *Large White x Landrace* da parte di madre ed ibrido commerciale da parte di padre.
I suinetti sono stati successivamente suddivisi in tre gruppi identificati come gruppo 1 formato da 19 animali, gruppo 2 e gruppo 3 costituiti da 20 soggetti ciascuno.
I suinetti del gruppo 1 sono stati svezzati a 28 giorni di vita, come previsto dal D.Lgs. 20/02/2004, n. 53, mentre i suinetti dei gruppi 2 e 3 sono stati svezzati più precocemente a 22 giorni. Gli animali appartenenti al gruppo 3 sono stati trattati a partire dal giorno dello svezzamento (giorno 0) per 10 giorni consecutivi con IFN-α somministrato nell'acqua di bevanda, ad un dosaggio pari a 1 UI/kg di p.v./die; tale somministrazione è stata eseguita mediante l'ausilio di un dosatore automatico, al fine di riuscire a regolare in modo corretto l'assunzione della citochina in funzione del fabbisogno idrico previsto per gli animali.

1.2. Parametri clinici e crescita
A 15 giorni di vita i suinetti sono stati identificati e sottoposti ad una valutazione clinica generale (esame obiettivo generale), al fine di escludere stati patologici che potessero influenzare negativamente l'esito della sperimentazione. Successivamente, a intervalli periodici, ogni soggetto è stato sottoposto a pesatura per la valutazione dell'incremento ponderale giornaliero (IPG).

1.3. Prelievi ed analisi di laboratorio

Ogni suinetto a 0, +6 e +26 giorni dallo svezzamento è stato sottoposto ad un prelievo di sangue in provette prive di anticoagulante. Una volta in laboratorio, il sangue raccolto è stato mantenuto a temperatura ambiente per 2 ore, successivamente refrigerato per 30 minuti e quindi centrifugato a 4°C per 15 minuti a 2000 rpm, in seguito è stato raccolto il siero e conservato a -80°C. Su tali campioni, sono state valutate su colture cellulari le seguenti citochine: TNF-α (valutazione citotossicità su cellule WEHI 164, come descritto in Asai, T., *et al.* 1993), IL-6 (saggio biologico di crescita su cellule 7TD1 dipendenti da IL-6, Grenett, H.E., *et al.* 1991), IFN–α (valutazione attività antivirale su cellule MDBK, Meager A. 1987).

1.4. Analisi statistica

La valutazione degli effetti distinti del tempo trascorso in allevamento e del trattamento con IFN–α sugli indici di accrescimento ponderale è stata effettuata mediante analisi della varianza a due stadi (Prism 2.01, GraphPad Software, San Diego, CA). La soglia di significatività è stata posta a $P < 0.05$.

RISULTATI

2.1. Parametri clinici e di crescita

Al momento dell'inclusione nella prova tutti gli animali erano in ottime condizioni sanitarie. Le nidiate degli animali in esame hanno manifestato buone condizioni cliniche per tutta la durata della prova, al pari delle altre nidiate presenti nel medesimo capannone. In particolare, non si sono riscontrate differenze cliniche tra i suini svezzati precocemente (22 giorni) e quelli svezzati più tardivamente (28 giorni).

Gli accrescimenti ponderali dei suinetti sono riportati in tabella 1. A tale proposito, emerge una differenza significativa ($P<0.001$) tra gli animali del gruppo 2 e quelli del gruppo 3; infatti i soggetti trattati con IFN-α (gruppo 3) hanno presentato a 47 giorni di vita un incremento complessivo di circa 1,5 kg in più rispetto al gruppo non trattato (tabella 1).

Tabella 1: Accrescimento ponderale dei suinetti

Giorni attorno allo svezzamento (giorni di vita)

	- 9 (19)	**-1 (21)**	**+6 (28/34)**	**+12 (34)**	**+19 (47)**	**+26(48)**
Svezzati 28 gg	5.974±0.716	NE	10.16±0.898	NE	15.24±1.759	
Svezzati 22 gg	NE	6.028±0.931	7.667±1.383	8.667±1.562	NE	13.72±2.396
Svezzati 22 gg trattati IFN α	NE	7.075±1.15	8.800±1.250	9.525±1.23	NE	15.200±2.353

I dati sono espressi come peso medio in Kg ± 1 deviazione standard; in grassetto sono riportati i dati ponderali dei suinetti corrispondenti ai medesimi giorni di vita all'interno dei 3 gruppi

Results are shown as mean weight (Kg) ± 1 standard deviation; weight data corresponding to the same age of piglets in the three groups are highlighted in bold.

Suddividendo il periodo che va dai 21 giorni di vita ai 48 in tre fasce (21-28 , 28-34 , 34-48 giorni), non è possibile evidenziare alcuna differenza tra gli IPG medi dei due gruppi di suinetti svezzati a 22 giorni durante il primo periodo, mentre nel secondo (28-34 g) il gruppo 3 presenta addirittura un IPG medio inferiore rispetto al gruppo 2. La differenza tra il gruppo dei trattati e dei non trattati appare invece evidente durante il terzo periodo (34-48 g) con una dinamica nettamente più favorevole nei trattati (tabella 2).

Tabella 2: Accrescimento ponderale medio giornaliero dei suinetti svezzati a 22 giorni

Gruppo suinetti	21-28 giorni	28-34 giorni	34-48 giorni
2, svezzato a 22 g	239±123 g	171±103 g	361±99 g
3, svezzato a 22 g +IFN-α	246±72 g	123±94 g	404±105 g

I valori sono espressi in grammi come media ± 1 deviazione standard
Daily mean weight gains (grams) are shown as mean ± 1 standard deviation.

2.2. Parametri ematici

Per quanto riguarda i parametri immunologici, il TNF-α sierico diminuisce in tutti i gruppi nella prima settimana post-svezzamento, per poi aumentare fino al giorno +26 (tabella 3) con una risposta particolarmente elevata nel gruppo 2, dove 20 soggetti su 20 hanno presentato una risposta superiore a 300 pg/ml. Nei soggetti svezzati a 22 giorni, l'andamento di questa citochina risulta essere inversamente proporzionale rispetto ai valori sierici di IL-6, per la quale si assiste ad un aumento nella prima settimana post svezzamento seguito da drastica diminuzione fino al giorno +26 con valori di 2,5 pg/ml (tabella 4). I valori di IL-6 sono inoltre particolarmente elevati nel gruppo 1 svezzato a 28 giorni.

Tabella 3: Valori di TNF-α sierico

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	178 (2/19)	36 (1/19)	736 (13/19)
2 svezzato a 22 g	450 (6/20)	108 (2/20)	12050 (20/20)
3 svezzato 22 g +IFN-α	364 (7/20)	65 (2/20)	2613 (13/20)

Viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione e, tra parentesi, il numero di suini sul totale con presenza di elevata risposta (≥ 300 pg/ml).

Serum TNF-α concentrations (pg/ml) are shown as 75% percentile values. Also, the number of high-responder pigs (≥ 300 pg/ml) out the total is reported between brackets.

Tabella 4: Valori di IL-6 sierici

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	≥10000	5770	2.5
2 svezzato a 22 g	450	5180	2.5
3 svezzato 22 g +IFN-α	2317	5725	2.5

Viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione.
Serum IL-6 concentrations (pg/ml) are shown as 75% percentile values.

Per quanto concerne la produzione di IFN-α endogeno, la risposta nella prima settimana post svezzamento risulta meno frequente nei suinetti svezzati a 28 giorni (gruppo 1), con 7 soggetti positivi su 19, rispetto ai suinetti dei gruppi 2 e 3 svezzati a 22 giorni. Infatti, nel gruppo dei non trattati si evidenzia una produzione in IFN–α in 20 suinetti su 20, nel gruppo dei trattati in 18 soggetti su 20. La frequenza di risposta a 26 giorni dallo svezzamento rimane costante nel gruppo 1, mentre diminuisce nei gruppi 2 e 3 (Tabella 5).

Tabella 5: Numero di suini sul totale con presenza di IFN-α nel siero.

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	1/19	7/19	7/19
2 svezzato a 22 g	1/20	20/20	1/20
3 svezzato 22 g +IFN-α	0/20	18/20	4/20

Number of IFN alpha- positive sera out of the total.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio svolto aveva come scopo quello di valutare le possibili alterazioni in senso pro-flogistico causate dallo svezzamento precoce nei suinetti in condizioni di campo e determinare l'eventuale ruolo di regolatore omeostatico di IFN-α somministrato agli animali *per os* a basso dosaggio.
La disregolazione della risposta flogistica allo *stress* è alla base delle alterazioni cliniche che sono normalmente osservate in questa fase del ciclo zootecnico, cui possono concorrere gli effetti di precarie condizioni igienico-sanitarie e di management aziendale.
I suini di questa prova sono stati allevati con elevati standard zootecnici, per cui i dati riportati sono da imputare esclusivamente al fattore svezzamento e non da concomitanti problemi clinici. Per quanto concerne le citochine analizzate in questo studio, TNF alfa e IL-6 sono fisiologicamente presenti a bassa concentrazione (<50 pg/ml) nel siero dei suini di diverse fasce di età (Amadori M., dati non pubblicati). IFN-α è invece fisiologicamente assente nel siero dei suini non sottoposti a *stress* di natura infettiva o non infettiva (Amadori M., 2007).
Con questo esperimento è stato confermato che il precoce allontanamento dalla madre (a 22 giorni) determina uno *stress* maggiore negli animali rispetto ad uno svezzamento più tardivo. A tale proposito, la cospicua risposta nei gruppi 2 e 3 in IFN-α e in TNF-α rispettivamente a +6 e +26 giorni dallo svezzamento dimostra come lo svezzamento a 22 giorni determini uno stress maggiore nei suinetti rispetto ad uno svezzamento più tardivo (28 giorni). I nostri dati confermano nel complesso il forte impatto in senso proflogistico causato dallo svezzamento precoce in accordo con i dati presenti in letteratura (Nabuurs M.J.A. *et al.* 1993, Piè S. *et al.* 2004, Zabielski *et al.* 2008). Sono state altresì approfondite le modalità di reazione omeostatica del suino a tale *stressor* ambientale e si è messo in luce il ruolo di IFN-α nella strategia adattativa dell'organismo.
I dati in nostro possesso mostrano che le differenze di accrescimento ponderale nei suini del gruppo 3 (trattato con IFN-α) rispetto a quelli del gruppo 2, non si

evidenziano a ridosso dello svezzamento, bensì a distanza di due-tre settimane; tale discrepanza non è invece evidente tra soggetti del gruppo 1 e 3 che a 47 giorni di vita raggiungono il medesimo peso medio. Pertanto, l'effetto positivo della somministrazione esogena di IFN-α si rende evidente a circa 26 giorni dallo svezzamento in concomitanza con la diminuzione della sua produzione endogena ed un deciso incremento del TNF-α sierico, assai maggiore nel gruppo 2 rispetto al gruppo 3. Questo dato conferma quanto già evidenziato nel modello suino SPF studiato in precedenza, dove la somministrazione di IFN-α *per os* migliorava la risposta omeostatica allo *stress* scatenato dallo svezzamento precoce. Risulta pertanto che la somministrazione esogena di IFN-α possiede un effetto positivo sui circuiti di regolazione delle citochine infiammatorie. Infatti, la maggiore risposta in IFN-α endogeno nei suini dei gruppi 2 e 3 rispetto ai soggetti del gruppo 1, induce a pensare che lo stress dello svezzamento precoce costringa i suini ad una maggiore risposta omeostatica compensativa; questa potrebbe essere in relazione anche con la maggiore immaturità dell'epitelio intestinale, che è sottoposto ad un cambiamento nell'assunzione dei nutrienti della dieta *starter*.
I dati zootecnici, seppur caratterizzati da un' ampia deviazione standard in alcuni gruppi, si prestano ad interessanti valutazioni che dovranno essere approfondite utilizzando in futuro gruppi sperimentali più numerosi. Il miglior accrescimento ponderale medio nei soggetti trattati con IFN-α potrebbe essere in parte determinato dalla differenza di peso presente tra i due gruppi prima dello svezzamento, tenendo presente che il peso medio delle nidiate allo svezzamento può essere predittivo dell'accrescimento futuro. Tale ipotesi non sembra però trovare conferma nell'analisi degli incrementi ponderali medi giornalieri nelle diverse settimane post svezzamento (tabella 2), da cui si evince che il deciso vantaggio a favore dei suinetti trattati si realizza nella terza settimana post svezzamento in relazione ad un miglior contenimento della risposta in TNF–α sierico (tabella 3). I risultati ottenuti indicano in sostanza che la somministrazione di IFN-α agevola la risposta omeostatica del suinetto agli *stressors* ambientali che si verificano allo svezzamento.

I risultati sopra riportati sono stati ottenuti nell'ambito del progetto finanziato dal Ministero della Salute, codice IZSLER PRC2005002.

Bibliografia

1. Amadori M., 2007. The role of interferon-α as homeostatic agent in the infiammatory response: a balance between danger and response? J. IFN Cyt. Res., 27, 181-189
2. Asai, T., *et al.* 1993. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Immunol. Immunopathol. 38:253-260.
3. Barnett K.L. *et al.* 1989. Characterization of creep feed consumption and its subsequent effects on immune response, scouring index and performance of weanling pigs. J. Anim. Sci., 67, 2698-2708
4. Grenett, H.E., et al. 1991. Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in Escherichia coli. Gene 101:267-271.
5. Meager A. 1987. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing, AJH, eds. Lymphokines and interferons, a practical approach, Oxford: IRL Press Limited, 129-147.
6. Nabuurs M.J.A. et al. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in The Netherlands. Res. Vet. Sci., 55, 78-84
7. Piè S. et al. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. J. Nutr., 134, 641-647
8. Zabielski *et al.* 2008. Control of development of gastrointestinal system in neonates. J. Physiol. Pharmacol., 59, 35-54.

Non puoi non notarci

Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al. Forti di questa filosofia vincente, ogni giorno creiamo e sviluppiamo nuovi prodotti, tecnologie e servizi adatti ad ogni singola esigenza produttiva.
Una "soluzione su misura" per noi della Dox-al non è un semplice slogan pubblicitario ma, da sempre, lo scopo principale della nostra esistenza... da quarant'anni!
Su Dox-al si può contare, come non notarlo?

dox-al

doxal.com

Dox-al Italia S.p.A.
Via Mascagni, 6 - 20050 Sulbiate (MI) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

PREVALENZA DI SUINI CRIPTORCHIDI, MASCHI INTERI ED ERMAFRODITI AL MACELLO E VALUTAZIONE OLFATTIVA DELL'ODORE DI VERRO

PREVALENCE OF CRYPTORCHID, ENTIRE MALE PIGS AND HERMAPHRODITES AT SLAUGHTERHOUSE AND SENSORY ANALYSIS OF BOAR TAINT

S.GRADELLINI[1], C.MAZZONI[1], O.BASSOLI[2], E.MOSCARDINI[2], G.ORLANDI[2], L.GENTILE[2], E.FERRARI[2]

[1]*Veterinario libero professionista – Reggio Emilia*
[2]*AUSL Modena – Distretto di Carpi*

Parole chiave: macello, criptorchidismo, odore sessuale, androstenone

Key words: slaughterhouse, cryptorchidism, boar taint, androstenone

Riassunto. Il criptorchidismo è un'anomalia che si rileva spesso in sede di macellazione. Frequente può essere anche il rilevamento di suini maschi interi non castrati durante la prima settimana. Le carni di questi soggetti possono manifestare un tipico odore sessuale, apprezzabile sia in sede di macellazione che dopo la cottura. Questo carattere spesso ne comporta l'esclusione dal consumo umano con perdite economiche per l'allevatore. Ma qual è la frequenza di rilevamento del criptorchidismo e di maschi interi al macello? E quante volte si può percepire odore di verro in tali soggetti?

Abstract. Cryptorchidism is one of the most frequent defect detected at slaughterhouse. Detection of entire male pigs not castrated at the first week of life is frequent too. The main problem concerned with cryptorchidism is alteration of meat organoleptic characteristics caused by a pronounced sexual odour. If meat indicates a pronounced sexual odour, it is to be declared unfit for human consumption. For this reason, these anomalies can bring about economic losses for producers. But which is the prevalence of cryptorchidism in fattening pigs at slaughterhouse? And how much is boar taint perceptible in cryptorchid and entire male pigs?

INTRODUZIONE

Il criptorchidismo nel suino è il difetto dell'apparato genitale che si riscontra più frequentemente nei soggetti di sesso maschile (Edwards & Mulley, 1992). I testicoli nel suino normalmente discendono negli ultimi 30 giorni di gestazione e dovrebbero essere palpabili alla nascita. Il criptorchidismo è caratterizzato dalla mancata migrazione o dalla discesa incompleta di uno o di entrambi i testicoli e pertanto può essere unilaterale o bilaterale. Si parla di criptorchidia addominale se il testicolo permane nell'addome, di criptorchidia inguinale se si è impegnato nello spazio inguinale. In ogni caso è piccolo, molle ed incapace di una spermatogenesi normale. Se entrambe le gonadi presentano tale anomalia, l'animale

è infecondo, ma conserva tutti i caratteri sessuali secondari dei soggetti normali della sua specie (Baron, 1994).
La conseguenza principale di questa anomalia è prettamente economica in quanto la presenza di testicoli ritenuti o mal castrati può conferire alla carcassa un tipico odore sessuale, che può comportare direttamente l'esclusione delle carni dal consumo umano con risvolti economici negativi per l'allevatore.
L'odore di verro è apprezzabile già dopo la macellazione, soprattutto nel tessuto adiposo e quando la carcassa è ancora calda. Una volta raffreddata, l'odore sessuale si attenua fortemente, ma può ricomparire dopo la cottura. Tali odori sono percepibili allo stesso modo nei maschi interi, quanto nei maschi castrati e più raramente negli ermafroditi. L'odore dei suini affetti da criptorchidismo è molto percepibile, ma può essere differente da quello dei maschi interi (Marcato, 1995).
Nei verri l'odore sessuale è causato principalmente dall'androstenone, quando supera 0,5-1 µg per grammo di grasso. Inoltre è rilevante anche il contributo di altri composti, come lo scatolo e l'indolo. Il limite di accettabilità dello scatolo è di 0,25 µg per grammo di grasso. La percezione dell'odore di verro non è solo legata alla concentrazione dell'androstenone e dello scatolo, ma anche ad una fondamentale sensibilità individuale della persona associata a diversi fattori, fra cui l'etnia ed il sesso: infatti è percepito dall'81% delle donne e circa dal 73% degli uomini. Si calcola inoltre che circa il 25% dei consumatori non sono in grado di avvertire la presenza dell'androstenone, mentre lo scatolo viene percepito indistintamente da tutte le persone. Lo scatolo è prodotto sia nell'intestino del verro che della scrofa per effetto della decarbossilazione del triptofano ad opera dell'attività microbica a livello del colon; per via delle sue proprietà lipofile, si accumula poi nel tessuto adiposo (Marcato, 1995). La scissione dello scatolo assorbito dall'organismo è inibita dagli steroidi sessuali, per questo tende ad accumularsi nel maschio quando al raggiungimento della pubertà i testicoli cominciano a produrre una maggiore quantità di testosterone. Le quantità prodotte di scatolo sono influenzate dal tipo di alimentazione: un alto contenuto di carboidrati non digeribili ridurrebbe la produzione di scatolo.
Attualmente non esistono dati sulla frequenza del criptorchidismo in suini grassi allevati nel nord Italia. Per attribuire un peso economico alla presenza di questa anomalia, il macello può rappresentare un'utile fonte di informazione. Questo lavoro si propone di studiare la prevalenza e le caratteristiche del criptorchidismo rilevato al macello in suini grassi provenienti da differenti allevamenti del nord Italia. Sono stati presi in considerazione anche i suini mal castrati ed ermafroditi. Su tutti i soggetti con presenza di testicolo è stata effettuata un'analisi olfattiva per identificare la presenza di odore sessuale e la relativa intensità.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un unico stabilimento di macellazione su un campione di 82260 suini grassi indifferentemente di sesso maschile e femminile macellati ad un peso compreso tra 150 e 180 Kg e provenienti da 142 differenti allevamenti ubicati nel nord-Italia, condotto nel periodo compreso dall'ottobre 2007 a giugno 2008. È stata presa in considerazione la presenza di suini criptorchidi e soggetti mal castrati. Su tali soggetti è stata valutata l'intensità di odore sessuale così da poter suddividere gli animali in tre categorie diverse: 1) Soggetti con odore sessuale assente; 2) Soggetti con lieve odore sessuale; 3) Soggetti con intenso odore sessuale. Veniva valutato un soggetto con lieve odore sessuale

qualora presentasse un odore di verro appena percepibile accostandosi alla carcassa. Nel momento in cui un suino presentava un odore marcatamente percepibile, a volte anche a metri di distanza, questo veniva considerato come soggetto con intenso odore sessuale. L'esame olfattivo rimane chiaramente una valutazione puramente soggettiva, ma si è mantenuta comunque omogenea in quanto effettuata per tutto il corso dello studio personalmente dall'autore.

RISULTATI

In 90 dei 142 allevamenti indagati (63%) si è potuta osservare la presenza di almeno un suino criptorchide, con una media di 0,4% suini criptorchidi per allevamento. In totale si sono evidenziati 278 suini criptorchidi su 82260 (0,34%). Si trattava di criptorchidia addominale nella maggioranza dei casi (98,5%), mentre solo una minoranza presentava criptorchidia inguinale (1,5%). Inoltre, dei 274 criptorchidi addominali, ben 249 (92,2%) erano monolaterali e 21 soggetti (7,8%) presentavano criptorchidismo bilaterale; i restanti 4 soggetti presentavano il testicolo controlaterale in posizione normale nella loggia scrotale. Sono stati osservati anche 11 suini ermafroditi pari ad una percentuale di 0,013% sul totale dei suini campionati (Fig.1).

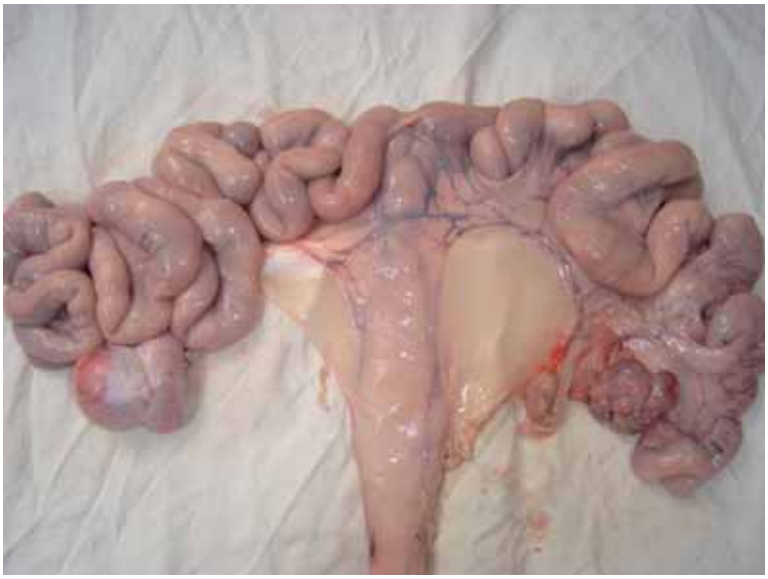


Fig.1 – Ermafroditismo in un suino. Raramente in tali soggetti è percepibile un odore sessuale.

Fig.1 – Hermaphroditism in a pig. Boar taint is rarely perceptible in these subjects.

I soggetti maschi interi riscontrati sono stati 120 (0,14%), sia monolaterali che bilaterali, probabilmente frutto di dimenticanza o di non curanza da parte degli operatori in fase di castrazione, oppure segno di una discesa più tardiva del testicolo ritenuto in addome rispetto al periodo di castrazione.

Tab.1 – Prevalenza di suini criptorchidi, interi ed ermafroditi al macello (livello di confidenza 95%) e valutazione olfattiva dell'odore sessuale

Tab.1 – Prevalence of cryptorchide and entire male pigs at slaughterhouse and boar taint evaluation

			ODORE SESSUALE (%)		
	%	LC 95%	ASSENTE	LIEVE	INTENSO
CRIPTORCHIDI	0,34	0,30-0,38	83,1	16,2	0,7
MASCHI INTERI	0,14	0,12-0,17	83,3	15,8	0,9
ERMAFRODITI	0,013	0,005-0,021	-	-	-

Da notare che questi dati potrebbero essere sottostimati in quanto non si è tenuto in considerazione degli allevamenti che eventualmente trattano i criptorchidi per via chirurgica o sottopongono a castrazione i suini non castrati ad età avanzata tramite l'intervento del veterinario. Inoltre la frequenza di rilevamento di suini criptorchidi si riferisce a una popolazione totale comprendente sia soggetti di sesso maschile sia soggetti di sesso femminile: si è voluto dare in questo modo una stima della prevalenza della anomalia in una popolazione convenzionale in cui non si effettua allevamento a sessi separati.

Dei 278 suini criptorchidi, ben 231 (83,1%) non presentavano un odore sessuale percepibile, 45 (16,2%) presentavano un lieve odore sessuale, solamente 2 (0,7%) hanno manifestato un intenso odore di verro. Nettamente sovrapponibili i dati relativi ai maschi interi: 100 (83,3%) non presentavano odore, 19 (15,8%) presentavano un odore percepibile, solo 1 (0,9%) ha evidenziato un odore sessuale intenso marcatamente percepibile (**Tab.1**).

DISCUSSIONE

Il criptorchidismo si è rivelato essere una anomalia piuttosto frequente nell'allevamento suino andando a colpire mediamente 4 soggetti su 1000 nell'ambito di una popolazione che comprende sia maschi che femmine. In sede di macellazione si è potuta osservare anche una discreta percentuale di maschi interi che spesso erano di stessa provenienza.

È risaputo che la presenza di suini criptorchidi o maschi interi in sede di macellazione può comportare l'esclusione delle carni dal consumo per la presenza di odore di verro, la cui incidenza può oscillare tra il 10 e il 75% (Xue et al, 1996). Altri svantaggi possono essere un incremento dell'aggressività e dell'attività sessuale che sfociano in lesioni cutanee (carcassa) e problemi agli arti (Thun et al, 2006). I combattimenti per stabilire la gerarchia durante la formazione di nuovi gruppi possono influire sui livelli di testosterone, androstenone e scatolo (Giersing et al, 2000).

Ma qual è generalmente la destinazione delle carcasse di suini criptorchidi o non castrati? Attualmente non è più richiesto il bollo barrato per suini criptorchidi o non castrati ai fini della loro destinazione alla produzione di prodotti cotti, come disponeva il D.Lvo 286/94, ora abrogato. Attualmente il Reg.CE 854/04 prevede che le carni siano dichiarate non idonee al consumo umano se "*presentano anomalie organolettiche, in particolare un intenso odore sessuale*". Dunque la normativa tiene in considerazione solo l'odore sessuale 'intenso': questo comporta che le carni di suini criptorchidi o ma-

schi interi che presentano anche solo un lieve odore sessuale siano adibite al consumo umano, senza operare più distinzioni con le carni di soggetti normalmente castrati.
La scelta di adibire al consumo le carni di soggetti criptorchidi o non castrati può risultare controversa, in quanto soggetta a variabilità per la diversa sensibilità individuale all'odore di verro che vi può essere tra un ispettore e l'altro. Certamente utile potrebbe essere avvalersi di indagini analitiche più oggettive, come l'ausilio di test rapidi. In alcuni macelli della Germania si usa trattenere per 24 ore gli animali con odore sessuale e sottoporre un pezzo di carne con grasso alla prova della cottura (bollitura in pentola) (Marcato, 1995). Per evitare qualsiasi residuo, nei paesi asiatici alcune macellerie specializzate vendono addirittura solo carne di femmine.
In questo lavoro si è potuto osservare che la presenza di odore sessuale percepibile in carcasse provenienti da suini criptorchidi e maschi interi è abbastanza relativa: infatti solo un 15-16% dei criptorchidi ha evidenziato un lieve odore di verro, la parte restante non l'ha evidenziato per niente, almeno nella soglia sensorialmente percepibile dell'autore. Invece l'1% dei soggetti criptorchidi e interi ha manifestato un odore di verro intenso, pari a 0,001-0,002% sul totale dei suini campionati. Questo sta a significare che circa due o tre soggetti su una popolazione di 100.000 maiali possono avere qualche problema nell'ammissione al consumo. Non si sono evidenziate differenze significative di odore sessuale in termini di intensità tra suini criptorchidi e maschi interi.
È possibile, a nostro giudizio, migliorare l'incidenza del problema attraverso la formazione di due figure professionali, peraltro spesso già presenti in azienda. La prima è quella del tecnico della sala parto preposto alla castrazione. Questi deve essere preparato a riconoscere, e successivamente evidenziare anche solo con una targa auricolare od una incisione del padiglione, quei soggetti che non presentano uno od entrambi i testicoli al momento della castrazione. Il secondo, doverosamente il veterinario aziendale, adeguatamente preparato per la chirurgia addominale di questi soggetti.
La **terapia chirurgica** del criptorchidismo consiste nella rimozione del testicolo ritenuto attraverso l'anello inguinale esterno, ed è applicabile in soggetti giovanissimi allo svezzamento od addirittura in sala parto, purché in anestesia generale (Mazzoni et al, 2004). Questa procedura si affianca alla rimozione del testicolo ritenuto per via laparotomica, già da tempo conosciuta e più indicata per i soggetti di pesi maggiori (Tonon et al, 2000). La terapia chirurgica ha percentuali di successo pressoché del 100% e non presenta inconvenienti particolari (Mazzoni et al, 2007). Anche la castrazione di soggetti mal castrati è facilmente applicabile in campo, persino in soggetti di età avanzata. A questo proposito va ricordato il D.Lvo 534/1992 e successive modifiche, che dispone, qualora la castrazione venga praticata dopo il settimo giorno di vita, sia eseguita da un medico veterinario previo impiego di anestetici e somministrazione prolungata di analgesici.
Una valida alternativa alla riduzione chirurgica, che da alcuni anni sta riscuotendo grande successo in diversi mercati extraeuropei, soprattutto per la produzione del suino leggero/intermedio, è la **vaccinazione** nei confronti del GnRH. Tale tecnica, comunque reversibile, sfrutta il sistema immunitario del suino per sopprimere l'attività del GnRH e diminuire di conseguenza la funzione testicolare. L'effetto è la produzione di suini non castrati ma con la stessa qualità della carne dei maschi castrati chirurgicamente e delle femmine (Dunshea et al, 2001), oltre che prestazioni zootecniche (accrescimenti e rese) decisamente superiori. Secondo Dunshea et al (2001) il vaccino

sarebbe in grado di ridurre i livelli di androstenone e scatolo sotto il limite soglia nel 100% dei suini vaccinati.
La vaccinazione si pone come valida alternativa alla castrazione fisica dei suinetti, dunque presentando un impatto positivo anche sul benessere animale, visti gli sforzi comunitari volti a dare grande rilievo a questa tematica. Ad esempio, la Svizzera si prepara a vietare l'attuale pratica chirurgica senza anestesia con una legge che entrerà in vigore nei prossimi anni.
Ancora interessante è la strada percorsa verso il **sessaggio del seme**. Si tratta di una tecnologia emergente che ha il vantaggio di eliminare la necessità della castrazione chirurgica e migliorare nel contempo il benessere animale favorendo la selezione di sole femmine attraverso il seme (Thun et al, 2006).
Relativamente all'odore sessuale la percentuale di soggetti affetti da questa alterazione organolettica in sede di macellazione si è rivelata relativamente bassa. Tuttavia nel nostro caso ci si è fermati ad un mera valutazione olfattiva. Analisi di laboratorio avrebbero forse potuto identificare una percentuale maggiore di suini sopra la soglia di accettabilità di androstenone nel grasso. Test rapidi sono disponibili sul mercato, in particolare per individuare il livello di androstenone e scatolo che vengono utilizzati soprattutto nel Nord Europa (Danimarca). Il problema principale con lo **screening post-macellazione** è cosa fare della percentuale variabile di carcasse che eccedono la soglia. Si calcola che già a un peso di macellazione di 100-110 Kg approssimativamente il 20-50% dei suini presentino un livello di androstenone e scatolo superiore alla soglia (Thun et al, 2006).

CONCLUSIONI

I numeri del presente lavoro lasciano certamente riflettere. Viene infatti evidenziato che tanto il criptorchidismo (0.34%), quanto l'incidenza di maschi interi (0.14%) siano ancora ben presenti in sede di macellazione. Su 82260 suini macellati, circa lo 0.5% è interessato dal problema e il valore è ancora più importante se limitato alla sola popolazione di maschi che, rappresentando verosimilmente il 50% della popolazione macellata, porterebbe quasi all'1% il dato finale.
Possiamo sottolineare che ancora una volta il controllo dei punti critici, che in questo caso sono da ricercare nella castrazione in sala parto e nel primo svezzamento, possono rivelarsi assolutamente importanti per contenere, sino risolvere in buona misura, questo tipo di problematica che, anche a causa di nuove e più performanti linee genetiche, in alcuni casi può raggiungere livelli assolutamente preoccupanti. Al macello, sarebbe consigliabile prevedere nell'ambito di un piano qualità l'ausilio di indagini analitiche oggettive, come il test rapido dell'androstenone, per quelle carni provenienti da carcasse con odore di verro lievemente percepibile, per evitare che vengano destinate alla produzione di tagli pregiati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il dott.Paolo Bonilauri, IZSLER Sezione di Reggio Emilia, per la collaborazione.

Bibliografia

1. **BARON R,** (1994) "Anatomia comparata dei mammiferi domestici" vol. 4, Nuova edizione, Bologna, Edagricole.
2. **DUNSHEA FR, COLANTONI C, HOWARD K, McCAULEY I, JACKSON P, LONG KA, LOPATICKI S, NUGENT EA, SIMONS JA, WALKER J, HENNESSY DP,** (2001): "Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance". J Anim Sci, 79, 2524-2535.
3. **EDWARDS MJ, MULLEY RC,** (1992) "Malattie genetiche, congenite e neoplastiche", in: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'allaire S., Taylor D.J. "Malattie del suino", 7aed., Padova, Piccin Nuova Libraria S.p.A. 1996, 800
4. **GIERSING M, LUNDSTROM, ANDERSSON A,** (2000): "Social effects and boar taint: Significance for production of slaughter boars (Sus scrofa)". J Anim Sci, 78, 296-305.
5. **MARCATO PS,** (1995): "Patologia animale ed ispezione sanitaria delle carni fresche", p.409-410, Edagricole.
6. **MAZZONI C, BORRI E, GRADELLINI S, TONON F,** (2007) "Riduzione chirurgica del criptorchidismo nel suino". Summa n° 5, giugno 2007, 53-58.
7. **MAZZONI C, GHERPELLI M**, (2004), "Esperienze di anestesia del suino in condizioni di campo". Atti del XXX meeting annuale S.I.P.A.S., Salsomaggiore Terme (PR), 25-26/03/2004, 237-243.
8. **THUN R, GAJEWSKI Z, JANETT F**, (2006): "Castration in male pigs: techniques and animal welfare issues". Journal of Physiology and Pharmacology, 57, 189-194.
9. **TONON F, GHERPELLI M**, (2000): "Correzione chirurgica del criptorchidismo nel suino". Atti del XXVI meeting annuale S.I.P.A.S., Piacenza, 24-25/03/2000, 275-279.
10. **XUE J, DIAL GD, HOLTON EE, VICKERS Z, SQUIRES EJ, LOU Y, GODBOUT D, MOREL N**, (1996): "Breed differences in boar taint: relationship between tissue levels boar taint compounds and sensory analysis of taint". J Anim Sci, 74, 2170-2177.

ESPRESSIONE DELL'OSTEOPONTINA IN TESTICOLI SANI E CRIPTOCHIDI DI SUINO: RISULTATI PRELIMINARI

OSTEOPONTIN EXPRESSION IN NORMAL AND CRIPTORCHID BOAR TESTES: PRELIMINARY RESULTS

§S. AMEDEO, *F. CERRUTI, §M.T. CAPUCCHIO, §D. PALMERINI, #M. APICELLA, #M. GIBERTI, , §F. GUARDA, *S. MIOLETTI

§ Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO) e Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Torino; *Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Grugliasco (TO); # ASL 17/2 Saluzzo (Cuneo)

Parole chiave: criptorchidismo, osteopontina, suino, testicolo

Key words: boar, cryptorchidism, osteopontin, testis

Riassunto. Il criptorchidismo è la più frequente patologia congenita nei bambini e rappresenta un importante rischio di tumore testicolare ma la sua eziologia è ancora in gran parte sconosciuta. L'osteopontina (OPN) è una glicoproteina fosforilata multifunzionale che svolge in molti tessuti importanti funzioni fisiopatologiche essendo coinvolta ad esempio nella migrazione cellulare, nella regolazione dei meccanismi immunitari, nei processi infiammatori e nella crescita tumorale. In questo lavoro abbiamo esaminato l'espressione dell'OPN in testicoli normali e in testicoli criptorchidi di suino utilizzando tecniche immunoistochimiche e Western blotting.
Nei testicoli sani una immunoreattività multifocale all'anticorpo anti-OPN è stata osservata a carico degli spermatozoi, degli spermatidi, degli spermatociti, in alcune cellule del Sertoli e nelle cellule interstiziali del Leydig; nei testicoli criptorchidi l'immunopositività si è osservata in alcuni spermatogoni e nelle cellule del Leydig.
Mediante Western blotting sono state identificate due bande reattive all'anticorpo anti-OPN, che migrano a 66 e 32- kDa, ed è stato interessante osservare che esse risultano molto più intense nei testicoli criptorchidi rispetto a quelli sani. Precedenti ricerche avevano ipotizzato un ruolo fondamentale per l'osteopontina nella spermatogenesi ma i nostri risultati preliminari suggeriscono altri possibili ruoli di questa molecola *in vivo* nel testicolo di suino e in particolar modo in quello affetto da criptorchidismo.

Abstract. Cryptorchidism is the most frequent congenital birth defect in male children and represents a risk factor for testicular cancer but its aetiology remains for the most part unknown. Osteopontin (OPN) is a multifunctional phosphorylated glycoprotein that in many tissues is involved in important physiopathological processes such as cell migration, regulation of immune cell function, inflammation and cancer progression. In this study we examined the expression of osteopontin in normal and in cryptorchid boar testes using immunohistochemical and Western blot analysis.
In normal testis immunoreactivity to anti-OPN antibody was detected in sperm, spermatids, spermatocytes, in few Sertoli cells and in Leydig cells with varying intensities while in cryptorchid testis immunostaining was seen in some spermatogonia and in Leydig cells.

Immunoblot analysis revealed in both normal and cryptorchid testes a 66-kDa and a 32-kDa-OPN immunopositive bands that interestingly were more intense in the cryptorchid ones. Previous works suggested that OPN in the testis could be involved in spermatogenesis but our preliminary findings lead to suppose other roles for this glycoprotein in vivo in the testis and in particular in the cryptorchid tissue.

INTRODUZIONE

L'osteopontina (OPN) è una fosfoproteina glicosilata identificata in diversi tessuti e fluidi organici; sembra che le sue funzioni biologiche riguardino principalmente l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare nonché i processi infiammatori cronici, le malattie autoimmuni e la crescita tumorale. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'OPN agisce tramite la produzione di segnali intracellulari e viene scissa da almeno 2 classi di proteasi (trombina e metalloproteasi della matrice) in frammenti a minore peso molecolare. Si è constatato *in vitro* che tali frammenti, oltre a mantenere le funzioni dell'OPN integra, acquistano anche altre attività biologiche, ma il loro ruolo *in vivo* risulta ancora in gran parte sconosciuto. Alcuni scienziati hanno studiato la distribuzione dell'OPN nel sistema riproduttivo maschile, inclusi testicolo ed epididimo, e hanno evidenziato differenze per quanto riguarda l'espressione della proteina, anche a seconda della specie animale considerata. Un recente articolo ha riportato la localizzazione dell'OPN nel testicolo di suino adulto e neonato e gli autori hanno ipotizzato un ruolo fondamentale di questa proteina nella spermatogenesi. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la presenza dell'OPN in testicoli di suino sani e criptorchidi, per verificare l'espressione di questa proteina anche in un tessuto patologico che non è in grado di produrre spermatozoi maturi.

MATERIALI E METODI

In questo lavoro preliminare sono stati utilizzati tre testicoli sani e tre testicoli criptorchidi di suini ibridi commerciali della razza Landrace, appartenenti al tipo pesante (p.v. 150-170 Kg). Gli animali sono stati macellati all'età di nove mesi e i testicoli immediatamente rimossi. Una parte dei tessuti è stata immersa in formalina tamponata per gli esami istologici e immunoistochimici e una parte è stata invece congelata in azoto liquido per l'analisi biochimica. I tessuti normali e patologici sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 5 µm. Dopo sparaffinatura, per l'esame istologico le sezioni sono state colorate con ematossilina eosina; per l'esame immunoistochimico, le sezioni sono state immerse in tampone citrato (0.01M, pH 6.0), trattate con H2O2 per bloccare l'attività di perossidasi endogene e, dopo lavaggi in tampone fosfato, i campioni sono stati incubati con l'anticorpo anti-human osteopontin (Rockland, USA) e la reazione sviluppata con il sistema avidina-biotina-perossidasi. Per l'analisi biochimica i tessuti congelati sono stati omogenati in tampone contenente 40 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 120 mM e 0.1% Nonidet P-40 utilizzando come inibitori delle proteasi leupeptina (0.5 µg/ml), PMSF (1mM) e aprotinina (5 µg/ml). Dopo aver effettuato la quantificazione proteica con il metodo di Bradford, i campioni (30µg/campione) sono stati separati elettroforeticamente (SDS-PAGE) e trasferiti su membrana di PVDF. Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo anti-OPN policlonale in grado di riconoscere la proteina intera di 66- kDa e il suo frammento C-terminale di 32- kDa,

formato per attività proteasica di trombina e metalloproteasi della matrice. Dopo incubazione della membrana con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi l'attività perossidasica è stata evidenziata con metodo chemiluminescente (ECL, Amersham Biosciences).

RISULTATI

L'esame istologico dei testicoli sani ha evidenziato i tubuli seminiferi contenenti spermatogoni, spermatociti, cellule del Sertoli, spermatidi e spermatozoi; nei testicoli criptorchidi si sono osservate cellule del Sertoli e spermatogoni oltreché numerose cellule interstiziali del Leydig di aspetto ipertrofico. L'esame immunoistochimico condotto sui testicoli sani ha mostrato una immunoreattività multifocale dell'OPN all'interno dei tubuli seminiferi e in particolare a carico degli spermatozoi, degli spermatogoni e degli acrosomi degli spermatidi, con un quadro simile a quello riportato in letteratura da Kim e Shin (2007). Nei testicoli criptorchidi l'immunoreattività è risultata uniformemente distribuita nel tessuto interstiziale a carico delle cellule del Leydig e qualche positività si è rilevata a carico di alcuni spermatogoni. (Fig. 1).

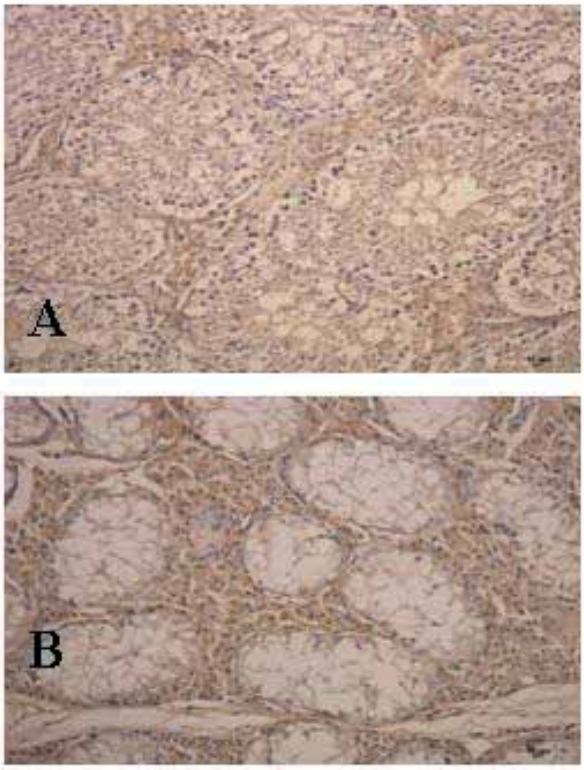


Fig 1: *Analisi immunoistochimica dell'OPN nel testicolo di suino normale (A) e criptorchide (B). Ingrandimento 20X.*

L'analisi mediante Western blotting ha messo in evidenza la presenza dell'OPN nei testicoli sani e in quelli criptorchidi, sia per quanto riguarda la forma integra della proteina (banda che migra a 66- kDa), sia per quanto concerne il suo frammento proteolitico (migrazione a 32- kDa) ma il dato assai interessante è che, in base a dati densitometrici, entrambe le bande a 66 e 32- kDa risultano maggiormente espresse nel tessuto patologico rispetto a quello normale (Fig. 2).

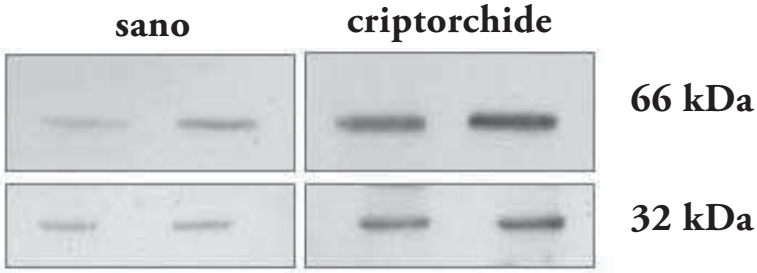


Fig 2: *Immagine rappresentativa di un'analisi mediante Western blotting dell'OPN nel testicolo sano e criptorchide di suino*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'OPN è stata scoperta inizialmente come una proteina della matrice ossea e in seguito identificata come una citochina, prodotta da cellule T attivate e da linee cellulari modificate, capace di attivare l'adesione cellulare, la chemiotassi e la trasduzione di segnali, legandosi a particolari recettori come certe integrine e alcune varianti della glicoproteina CD44. L'OPN viene sintetizzata, oltre che nel tessuto osseo, in numerosi altri organi, come l'orecchio interno, il cervello, il muscolo, la placenta e il sistema immunitario. In quest'ultimo viene espressa in diversi tipi cellulari come i macrofagi, i neutrofili, i linfociti T e B. Molte ricerche hanno messo in luce un coinvolgimento dell'OPN nei processi di rimarginazione delle ferite, nel rimodellamento osseo, nell'infiammazione (con attività pro- e anti-infiammatoria), nell'ischemia e nella risposta immunitaria, in alcune forme di stress, e per questo il suo ruolo è stato studiato in molte patologie con implicazioni flogistiche e immunitarie (es. artrite reumatoide, sclerosi multipla) e in malattie che interessano il tessuto osseo come osteoartriti e osteoporosi. Di grande rilievo inoltre sembra il coinvolgimento dell'OPN nella progressione e nella metastatizzazione tumorale, in particolare per quanto riguarda carcinomi della mammella, della prostata, della tiroide, del polmone e nel mieloma multiplo, tanto che per alcune forme neoplastiche si è ipotizzato di utilizzare la misura dei livelli plasmatici dell'OPN quale potenziale marker prognostico della malattia. Un dettaglio importante nella struttura dell'OPN è la presenza di siti di clivaggio per la trombina e per alcune metalloproteasi della matrice (MMP-3 e MMP-7), poiché la proteina idrolizzata espone siti di riconoscimento per specifici recettori non altrimenti visibili nella sua forma integra. Si è dimostrato che le proprietà funzionali della proteina clivata differiscono da quelle della proteina nativa e il ruolo biologico delle modificazioni proteolitiche si è ben osservato

in vitro in alcuni modelli sperimentali, in cui si evidenziano aumentata adesione e migrazione cellulare. Nel sistema riproduttivo maschile l'OPN è stata rilevata in vari distretti, come il testicolo, l'epididimo e gli spermatozoi. A questo proposito diversi lavori hanno dimostrato l'espressione dell'OPN nel toro, nel topo e nel ratto, però con qualche differenza nella localizzazione cellulare. Rodriguez et al., in un articolo del 2000, avevano osservato nel toro la presenza della proteina nell'ampolla dei vasi deferenti e nelle vescicole seminali, mentre nel testicolo l'OPN era stata identificata nei tubuli seminiferi, ma solo in quelli contenenti spermatidi allungati, il che suggeriva una relazione tra espressione della proteina e stadio di maturazione delle cellule germinali. Nelle cellule del Sertoli la proteina si era osservata solo nelle fasi più avanzate della spermatogenesi. In un lavoro più recente invece Erikson et. al. (2007) hanno identificato l'OPN anche nella membrana degli spermatozoi, ipotizzando un probabile ruolo della proteina nei processi di fertilizzazione. Per quanto riguarda il ratto l'OPN sembra essere presente nell'epididimo, negli spermatogoni e negli spermatociti ma risultati contradditori si osservano per le cellule del Sertoli e gli spermatidi. Nel testicolo di topo invece l'OPN è stata identificata con sicurezza sia nelle cellule germinali che nelle cellule del Sertoli. Un recente lavoro (Kim and Shin, 2007) ha evidenziato l'espressione dell'OPN nel testicolo di suino, sia per quanto riguarda lo stadio neonatale (suinetti di 1 giorno) che quello adulto. In quest'ultimo la proteina si è dimostrata variamente espressa nei tubuli seminiferi, interessando soprattutto i corpi residui e gli acrosomi negli spermatidi, e occasionalmente gli spermatogoni, gli spermatociti e le cellule del Sertoli. Anche le cellule del Leydig si sono osservate debolmente positive all'esame immunoistichimico. Nel neonato la proteina è risultata presente nel testicolo all'interno dei gonociti e in qualche cellula di sostegno nei tubuli seminiferi, così come nelle cellule del Leydig. L'analisi mediante Western blotting ha poi messo in evidenza nell'omogenato testicolare la presenza della proteina sia nella sua forma integra (66kDa) che frammentata (32kDa) nel testicolo dell'animale adulto, ma solo della forma ad alto peso molecolare nel neonato. In relazione a questi risultati gli autori hanno ipotizzato che l'OPN nel testicolo possa avere un ruolo nell'adesione delle cellule germinali alla membrana basale e alle adiacenti cellule del Sertoli e che sia utile allo sviluppo delle cellule germinali sia nell'adulto che nel neonato, anche con l'interessamento delle cellule interstiziali del Leydig. Nel nostro lavoro abbiamo voluto confrontare l'espressione dell'osteopontina nel tessuto testicolare sano di suino adulto con quello invece affetto da criptorchidismo, una patologia che rappresenta il più frequente difetto congenito dell'apparato genitale maschile nei bambini e che si è dimostrata anche il fattore di rischio meglio caratterizzato per quanto riguarda l'insorgenza di cancro testicolare (rischio 2-8 volte superiore alla media di popolazione nell'uomo). Nel nostro studio abbiamo potuto evidenziare come nel tessuto criptorchide di suino l'OPN risulti maggiormente espressa, sia per quanto riguarda la sua forma integra (66 kDa, Western blotting) che il suo frammento proteolitico a minore peso molecolare (32 kDa). Inoltre dal punto di vista immunoistochimico l'osteopontina appare distribuita variamente nel testicolo sano (negli spermatidi, spermatogoni, spermatociti, spermatozoi e in alcune cellule del Sertoli all'interno dei tubuli seminiferi e anche nelle cellule interstiziali del Leydig), confermando i dati dello studio precedente, mentre nel testicolo criptorchide una evidente immunopositività è risultata a carico di alcuni spermatogoni e soprattutto nelle cellule del Leydig nel

tessuto interstiziale. Il lavoro di Kim e Shin (2007) ipotizzava un ruolo fondamentale dell'OPN nella spermatogenesi ma con i nostri risultati abbiamo dimostrato la presenza della proteina anche in un tessuto che non è in grado di produrre spermatozoi maturi. Inoltre il fatto che l'OPN si sia dimostrata maggiormente espressa (sia nella sua forma integra che frammentata) nel tessuto criptorchide potrebbe essere conseguenza dello stress subito dal testicolo ritenuto, e potrebbe anche indicare un coinvolgimento della proteina nella potenziale trasformazione neoplastica del tessuto criptorchide. Dal nostro punto di vista perciò lo studio dell'OPN nel testicolo criptorchide è meritevole di ulteriori approfondimenti.

Bibliografia

- Bernal-Mañas C.M., Morales E., Pastor L.M., Pinart E., Bonet S., De la Rosa P., Briz M.D., Zuasti A., Ferrer C.and Canteras M. (2005) " Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (Sus domesticus) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism" Acta Histochem.107: 365-372.
- Erikson D.W., Way A. L., Chapman D.A., Killian G.J. (2007) "Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization" Reproduction 133(5):909-17.
- Kim S. and Shin T. (2007) "Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis" J.Vet. Sci. 8(2), 107-110.
- Wang K.X. and Denhardt D.T. (2008) "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses" Cytochine Growth Factor Rev. 19 (5-6), 333-45.
- Rodriguez C.M., Day J.R., Killian G.J. (2000) "Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract" J Androl 21: 414-20.
- Scatena M., Liaw L., Giachelli C.M. (2007) "Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease" Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(11), 2302-9.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEI PARAMETRI EMOCROMOCITOMETRICI IN SUINETTI SVEZZATI E SCROFE

REFERENCE INTERVALS OF HAEMATOLOGICAL PARAMETERS IN WEANED PIGLETS AND SOWS

I. ARCHETTI, S. ROTA NODARI, O. GUERRA, P. CANDOTTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia
email: paolo.candotti@bs.izs.it

Parole chiave: suinetto svezzato, scrofa, parametri ematici

Key words: weaning pig, sow, haematology parameters

Riassunto. Sono state selezionate 267 scrofe e 70 suinetti tra i 20 e i 40 giorni di vita in alcuni allevamenti commerciali del Nord Italia. Gli animali, tutti ibridi commerciali, erano risultati sani all'esame clinico. Da tutti gli animali sono stati eseguiti dei campioni ematici per i parametri di tipo emocromocitometrico (RBC, HGB, MCV, RDW, HCT, MCH, MCHC, WBC, NEUT, LYMP, MONO, EOS, BASO, PLAT). I dati raccolti sono stati elaborati statisticamente per ricavare intervalli di riferimento caratteristici dei parametri ematici valutati.

Abstract. 267 healthy sows and 70 healthy weaned piglets from 20 to 40 days old were selected in commercial farms of Northern Italy. Blood samples were collected from animals and tested for: RBC, HGB, MCV, RDW, HCT, MCH, MCHC, WBC, NEUT, LYMP, MONO, EOS, BASO, PLAT. Collected data were used to calculate percentile reference values for the selected parameters.

INTRODUZIONE

I valori ematici "normali" si riferiscono ad animali clinicamente sani, con un normale sviluppo e alimentati con diete bilanciate. Tali valori risultano essere influenzati da numerosi fattori quali la dieta, la stabulazione, la stagione, lo stadio della gravidanza, la fase di lattazione, la razza e il sesso (Wilson G.D. et al., 1972; Tewes H. et al., 1979; Groth Von W. et al., 1986; Framstad T. et al., 1991; Stern S. et al., 2000). Le procedure di campionamento e di analisi possono inoltre influenzare questi risultati (Tumbleson M.E. et al., 1986; Framstad T. et al., 1989; Dubreuil P. et al., 1990; Ihedioha J.I. et al., 2007). I range di "normalità" riportati in letteratura si riferiscono spesso ad animali selezionati a scopi sperimentali (Heath M.F. et al., 1991) e sono quindi di difficile utilizzo nelle condizioni di campo. Di fatto il concetto di intervallo di normalità ha perso il suo significato già a partire dagli anni sessanta, per essere sostituito dal concetto più proprio di "intervallo di riferimento"

(Lumsden J.H., 1998; Giavarina D. et al., 2001): intervallo di valori a cui è possibile "riferirsi" e che può essere utile nella attività clinica quotidiana.
L'esame emocromocitometrico è attualmente poco utilizzato nella pratica clinica suinicola, riteniamo comunque esso possa essere di valido ausilio come complemento ai piani di monitoraggio sanitario e produttivo e coadiuvante nella diagnosi, anche precoce, di molte malattie (in particolare per le malattie infettive, infiammatorie ed ematologiche come anemia e diatesi emorragica) (Faustini M. et al., 2002; Evans R.J., 1994; Odink J. et al., 1990; Smeets J.F. et al., 1990).

MATERIALI E METODI

Animali e prelievi

Per la prova sono stati selezionati a *random* allevamenti commerciali di suini del Nord Italia dove le condizioni sanitarie fossero buone e dove, al momento della visita, non fossero presenti focolai di malattia in nessun reparto. All'interno di ciascun allevamento sono stati selezionati suinetti allo svezzamento tra i 20 e i 40 giorni di vita e/o riproduttori che alla visita clinica fossero risultati in buone condizioni corporee e in buono stato di salute.
In totale sono stati sottoposti a prelievo ematico 70 suinetti appartenenti a 3 allevamenti e 267 riproduttori (37 scrofette e 224 scrofe) appartenenti a 13 diversi allevamenti.
Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare in provette contenenti anticoagulante K_3EDTA (Vacutainer®, Becton, Dickinson) ed è stato mantenuto alla temperatura di 4°C fino all'analisi di laboratorio. I campioni sono stati eseguiti al mattino e processati il giorno stesso.

Analisi di laboratorio

Le analisi sono state eseguite utilizzando l'analizzatore automatico CELL-DYN 3500R® (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA). Per ogni campione sono stati valutati i seguenti parametri: il numero totale degli eritrociti, la concentrazione emoglobinica (Hb), l'ematocrito, il volume corpuscolare medio (MCV), il contenuto emoglobinico medio per eritrocita (MCH), la concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC), l'ampiezza della distribuzione eritrocitaria (RDW), la conta piastrinica, il numero totale dei leucociti, il numero totale e la percentuale dei neutrofili, il numero totale e la percentuale dei linfociti, il numero totale e la percentuale dei monociti, il numero totale e la percentuale degli eosinofili, il numero totale e la percentuale dei basofili.

Analisi statistica

Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati applicando una statistica non parametrica. Per ogni parametro osservato è stata calcolata la distribuzione percentile dei valori ottenuti.
Per i parametri della serie rossa sono riportati i valori riferiti al 2.5° ($P_{.025}$) e 97.5° ($P_{.975}$) percentile, che definiscono il 95% centrale dei valori osservati. Per i parametri della serie bianca l'intervallo definito dal 2.5° al 97.5° percentile risulta molto

ampio, aumentando la probabilità di includere soggetti non sani; per questo sono riportati i valori riferiti al 10° ($P_{.10}$) e 90° ($P_{.90}$) percentile, che comprendono l'80% dei risultati.
Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software statistico R versione 2.8.0 rilasciata il 20 ottobre 2008.

RISULTATI

In tabella 1 e 2 vengono riportati i risultati ottenuti per i diversi parametri analizzati rispettivamente per la categoria "suinetti" (20-40 giorni di vita) e la categoria "scrofe".
In ogni tabella viene riportato il parametro analizzato, l'unità di misura utilizzata, il numero di soggetti su cui è stato effettuato il calcolo statistico, il valore riferito al 2.5° e al 97.5° percentile per eritrogramma e piastrine, il valore riferito al 10° e 90° percentile per il leucogramma e la mediana di osservazione.
In sintesi, tra i valori $P_{.025}$ e $P_{.975}$ indicati nella colonna, si colloca il 95% della popolazione sana osservata, tra i valori $P_{.10}$ e $P_{.90}$ si colloca l'80%.

Tabella 1. Parametri emocromocitometrici in suinetti (20-40 giorni)

Parametri	Unità di misura	n	P.025	mediana	P.975
Eritrociti	10^6/µL	67	4.96	*5.81*	6.61
Hb	g/dL	67	6.82	*10.2*	11.9
Ematocrito	%	66	21.8	*29.8*	37.2
MCV	Fl	66	39.4	*51.3*	60.1
MCH	pg	66	12.3	*17.4*	19.7
MCHC	g/dL	66	29.7	*33.8*	35.4
RDW	%	67	17.3	*23.2*	44.8
Piastrine	10^3/µL	69	209	*650*	924
			$P_{.10}$		$P_{.90}$
Leucociti	10^3/µL	70	6.81	*17.4*	25.6
Neutrofili	%	66	22.8	*37.7*	60.2
Linfociti	%	66	25.1	*49.8*	69.6
Monociti	%	66	3.85	*8.38*	15.6
Eosinofili	%	66	0.09	*0.62*	2.95
Basofili	%	66	0.11	*0.63*	2.02
Neutrofili	10^3/µL	66	1.57	*6.26*	13.6
Linfociti	10^3/µL	66	2.58	*8.12*	15.8
Monociti	10^3/µL	66	0.5	*1.76*	4.06
Eosinofili	10^3/µL	66	0.02	*0.08*	0.24
Basofili	10^3/µL	66	0.01	*0.09*	0.42

Legenda: n = n° di campioni utilizzati per il calcolo dei percentili
$P_{.10}$ e $P_{.90}$= percentile 10° e 90° della distribuzione
$P_{.025}$ e $P_{.975}$= percentile 2.5° e 97.5° della distribuzione

Tabella 2. Parametri emocromocitometrici in scrofe

Parametri	Unità di misura	n	P.025	mediana	P.975
Eritrociti	106/µL	262	4.27	*5.79*	7.68
Hb	g/dL	261	9.15	*11.9*	14.2
Ematocrito	%	261	26	*33.5*	41.6
MCV	Fl	261	47.3	*58.2*	65.7
MCH	pg	261	15.6	*20.5*	23.3
MCHC	g/dL	261	32	*35.2*	37
RDW	%	261	20	*22.5*	26.2
Piastrine	103/µL	265	50.6	*258*	542
			$P_{.10}$		$P_{.90}$
Leucociti	103/µL	266	9.35	*12.6*	20
Neutrofili	%	266	20.6	*38.9*	57.1
Linfociti	%	266	30.5	*47.1*	69.7
Monociti	%	266	4.78	*7.65*	10.7
Eosinofili	%	265	2	*4.7*	7.56
Basofili	%	266	0.11	*0.4*	0.9
Neutrofili	103/µL	263	2.6	*4.7*	7.9
Linfociti	103/µL	266	3.4	*5.6*	12.2
Monociti	103/µL	266	0.6	*1*	1.81
Eosinofili	103/µL	266	0.24	*0.6*	1.02
Basofili	103/µL	266	0	*0.02*	0.1

Legenda: n = n° di campioni utilizzati per il calcolo dei percentili
$P_{.10}$ e $P_{.90}$= percentile 10° e 90° della distribuzione
$P_{.025}$ e $P_{.975}$= percentile 2.5° e 97.5° della distribuzione

DISCUSSIONE

Sebbene la visita clinica non sia esaustiva per definire la completa sanità e il buono stato di nutrizione di un animale, in condizioni di campo rappresenta l'unico strumento di selezione "a priori" del campione da sottoporre ad indagine. E' noto, infatti, che diversi parametri ematologici sono fortemente influenzati da malattie croniche e da deficit nutrizionali (Wilson G.D. et al., 1972; Beisel W.R. et al., 1974; Dansk D.M., 1980; Mills C.F., 1974; Tumbleson M.E. et al., 1981; Friendship R.M. et al., 1984) ed è quindi fondamentale che il campione di indagine sia scelto con cura. E' importante ricordare che gli intervalli calcolati in questo studio sono riferiti rispettivamente al 95% (percentile 2.5°-97.5°) della popolazione campionata per quanto riguarda la linea rossa e all'80% (percentile 10°-90°) per quanto riguarda la linea bianca. Non si tratta di intervalli di normalità, ma di intervalli a cui riferirsi nell'interpretazione degli esiti di laboratorio per meglio effettuare le proprie scelte decisionali.
E' infine importante sottolineare che la trasferibilità degli intervalli di riferimento da un laboratorio all'altro è generalmente molto bassa (Giavarina D. et al., 2001) e l'utilizzo di valori di riferimento di letteratura non è corretto rispetto ai valori realmente prodotti dal singolo laboratorio.

CONCLUSIONI

La disponibilità di intervalli di riferimento dei parametri emocromocitometrici per i suini allo svezzamento e per le scrofe in produzione rappresenta, senza dubbio, un importante ausilio nella pratica clinica. Il reclutamento in futuro di ulteriori campioni da animali opportunamente selezionati consentirà di migliorare ulteriormente gli intervalli di riferimento.

Bibliografia

Beisel W.R., Pelsarek R.S. Wannemacker R.W. (1974) "The impact of infectious disease on trace element metabolism of the host". In: Hoekstra W.G., Gauther H.E., W. Mertz (ed.) "3th Harry Steenbock Symposium on Trace element metabolism in animals", Madison, Wisconsin, 1973, 217-238.

Danks D.M. (1980) "Pathology and diagnosis of copper deficiency – general discussion". In: "Ciba Foundation Symposium on Biological roles of copper", Londra, 11-13 marzo 1980, 152-161.

Dubreuil P., Couture Y., Tremblay A., Martineau G.P. (1990) "Effects of experimenters and different blood sampling procedures on blood metabolite values in growing pigs". Can J Vet Res. 54, 379-382.

Evans R.J. (1994) "Porcine haematology: reference ranges and the clinical utility of haematological examination in the pig". Pig Vet J. 32, 52-57.

Faustini M., Scocca S., Riccardi A., Munari E., Colombani C., Russo V., Maffeo G., Vigo D. (2002) "Indicazioni su alcuni aspetti ematologici, ematochimici e della funzione riproduttiva in scrofette". Archivio Veterinario Italiano 53, 41-51.

Framstad T., Havre G.N., Morberg H. (1989) "The effect of storage, separation and use of heparin on the clinical biochemical analysis of pig blood". Norsk Vet.-T. 101, 237-243.

Framstad T., Morberg H., Aass R.A. (1991) "Clinical biochemical analyses of pig blood. Reference ranges for sows". Norsk Vet.-T. 103, 807-815.

Friendship R.M., Lumsden J.H., McMillan I., Wilson M.R. (1984) "Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine". Can J Comp Med. 48, 390-393.

Giavarina D., Dorizzi R.M., Guerra G. (2001) "Linee guida per la produzione di intervalli di riferimento". Riv Med Lab – JLM 2, S.1, 99-105.

Groth Von W., Kalrchreuter S., Hahn R. (1986) "Influence of breed, age, season and change of housing on enzyme activity and mineral and urea concentrations in blood plasma of boars" Teil 1. Tierärztl. Umsch. 41, 652-658.

Groth Von W., Kalrchreuter S., Hahn R. (1986) "Influence of breed, age, season and

change of housing on enzyme activity and mineral and urea concentrations in blood plasma of boars". Teil 2. Tierärztl. Umsch. 41, 778-787.

Heath M.F., Evans R.J., Gresham A.C.J. (1991) "Blood biochemical reference ranges for sows under modern management conditions". Br Vet J. 147, 331-339.

Ihedioha, J.I., Onwubuche, R. C. (2007) "Artifactual changes in PCV, hemoglobin concentration, and cell counts in bovine, caprine, and porcine blood stored at room and refrigerator temperatures". Vet Clin Pathol. 36, 60-63.

Lumsden J.H. (1998) "Normal' or reference values: questions and comments". Vet. Clin. Path. 27, 102-106.

Mills C.F. (1974) "The detection of trace element deficiency and excess in man and farm animals". Proc Nutr Soc. 33, 267-274.

Odink J., Smeets J.F., Visser I.J., Sandman H., Snijders J.M. (1990) "Hematological and clinicochemical profiles of healthy swine and swine with inflammatory processes". J Anim Sci. 68, 163-70.

Smeets J.F., Odink. J., Visser I.J., Schoen E.D., Snijders J.M. (1990) "Haematology and blood-chemistry for predicting abscesses and other abnormalities in slaughtered pigs". Vet Q. 12, 146-51.

Stern S., Sjölund M., Fellström C., Sterning M., Andersson K. (2000) "Red blood cell parameters in piglets reared outdoors or indoors". In: Cargill C. and McOrist S. (ed.) "Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society", Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 192.

Tewes H., Steinbach J., Smidt D. (1979) "Investigation on the blood composition of sows during the reproductive cycle. Blood changes during lactation". Zuchthyg. 14, 111-116.

Tumbleson M.E., Scholl E. (1981) "Hematology and clinical chemistry" in: Leman A.D. "Diseases of Swine" 5a ed., Ames, Iowa, Iowa State University Press, 27-40.

Tumbleson M.E., Schmidt D.A., Scholl E. (1986) "Hematology and clinical chemistry" in: Leman A.D. "Diseases of Swine" 6a ed., Ames, Iowa, Iowa State University Press, 20-44.

Wilson G.D., Harvey D.G., Snook C.R. (1972) "A review of factors affecting blood biochemistry in the pig". Br Vet J. 128, 596–610.

www.r-project.org

VALUTAZIONE DI PARAMETRI IMMUNITARI IN SUINETTI ALIMENTATI CON SUPPLEMENTAZIONE A BASE DI FERMENTI LATTICI VIVI E MANNO-OLIGOSACCARIDI CON β-GLUCANI

EVALUATION OF IMMUNE PARAMETERS IN PIGLETS FED WITH LACTIC ACID BACTERIA, MANNAN-OLIGOSACCHARIDES AND β-GLUCANS IN SUPPLEMENTED FEED

PAOLO BORGHETTI[1], LUCA FERRARI[1], ELENA DE ANGELIS[1], LUCA MORANDINI[4], FREDERIC PELENC[2], GIULIO GABALDO[3], EZIO BOTTARELLI[1], PAOLO MARTELLI[1].

[1] Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma
[2] Original Process France
[3] Original Process Italia
[4] Veterinario libero professionista

Parole chiave: fermenti lattici vivi, manno-oligosaccaridi, β-glucani, suinetti, risposta immunitaria.

Key words: lactic acid bacteria, mannan-oligosaccharides, β-glucans, piglets , immune response.

Riassunto. Il presente studio ha analizzato alcuni parametri immunitari in suinetti che fino a 8 settimane di vita hanno ricevuto una supplementazione nella dieta con *Micronil®*, prodotto registrato ed in commercio a base di cereali germinati e fermentati mediante metodo FAP® con l'utilizzo di fermenti lattici vivi e contenente manno-oligosaccaridi con β-glucani, in confronto a scrofe e suinetti (controlli) non alimentati con tale supplementazione. La supplementazione delle scrofe e dei loro suinetti con *Micronil®* ha mostrato un significativo incremento della responsività linfocitaria nei suinetti in confronto ai suinetti controllo sia come secrezione di IFNγ che come attività proliferativa e metabolica dopo stimolazione aspecifica con PHA. Queste modificazioni si associano a più alti livelli di linfociti T γ/δ nel sangue. Ulteriori studi potranno confermare questi risultati preliminari e approfondirne le implicazione funzionali in termini di potenziale influenza sulla qualità dell'apporto latteo materno e di risposte immunitarie specifiche (i.e. vaccinazioni) o in presenza di infezione.

Abstract. This study analyzed some immune parameters in piglets fed up to 56 days of age with a supplementation of a registered feed additive (*Micronil®*) based on lactic fermentation (FAP® method) of cereals containing probiotic acid bacteria, mannan-oligosaccharides with β-glucans in comparison to control piglets not fed with this supplementation. Supplementing sows' and their piglets' feed, a significant increase of lymphocyte responsiveness in piglets when compared to controls was observed, both as IFNγ secretion and proliferative/metabolic lymphocyte activity after non-specific stimulation (PHA). These changes were associated with

higher levels of T γ/δ lymphocytes in blood. Further studies could confirm these preliminary results and better investigate functional implication as potential influence on sow milk quality and/or on the efficiency of specific immune response such as vaccination or during infection.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento intensivo del suino, la ricerca applicata sta analizzando tecniche manageriali e nutrizionali che siano in grado di potenziare la risposta difensiva nei confronti dei patogeni mediante modulazione e/o maturazione della risposta immunitaria locale e sistemica. Tali indagini appaiono importanti soprattutto nel periodo più critico per lo sviluppo dell'efficienza immunitaria che coincide col primo periodo di vita dei suinetti (periodo pre- e post-svezzamento) in cui la risposta immunitaria naturale e specifica non solo si sviluppa in termini strutturali e funzionali ma viene anche modulata da importanti stimoli di natura ambientale e vaccinale (Borghetti et al., 2006). In tale ottica, si è sviluppato l'interesse sugli effetti di pro-biotici e pre-biotici sull'ecosistema intestinale e sull'"educazione" del sistema immunitario mucosale e sistemico con, di conseguenza, potenziali effetti benefici non solo sulla salute dell'animale ma anche sulle performance di crescita (Kocher, 2005; Mordenti, 2005; Dritz et al., 1995; Davis et al., 2004).
Il presente studio ha analizzato alcuni parametri immunitari in suinetti che hanno ricevuto una supplementazione nella dieta con *Micronil*®, prodotto registrato ed in commercio a base di cereali germinati e fermentati mediante metodo *FAP*® con l'utilizzo di fermenti lattici vivi e contenente manno-oligosaccaridi con β-glucani, in confronto a scrofe e suinetti (controlli) non alimentati con tale supplementazione.

MATERIALI E METODI

Animali
La presente ricerca si è svolta in un allevamento convenzionale su gruppi di scrofe di razza *Goland* e sulle rispettive nidiate. Da 12 scrofe di secondo o terzo parto scelte casualmente si sono costituiti due gruppi di 6 scrofe ciascuno: un gruppo a cui è stata somministrata una dieta supplementata con *Micronil*® ed un altro gruppo (controllo) la cui alimentazione non prevedeva alcuna supplementazione.
Dalle nidiate delle scrofe controllo e trattate sono stati poi selezionati casualmente 4 gruppi di 6 suinetti ciascuno:
Gruppo 1 (TC): 6 suinetti, nati da scrofe che hanno ricevuto *Micronil*®, i quali NON hanno ricevuto dieta supplementata con *Micronil*®;
Gruppo 2 (TT): 6 suinetti, nati da scrofe che hanno ricevuto *Micronil*®, i quali hanno ricevuto alimentazione supplementata con *Micronil*® fino a 56 giorni di età;
Gruppo 3 (CT): 6 suinetti, nati da scrofe controllo, i quali hanno ricevuto alimentazione supplementata con Micronil® fino a 56 giorni di età;
Gruppo 4 (CC): 6 suinetti, nati da scrofe controllo, NON alimentati con supple-

mentazione nella dieta con *Micronil®*.
I suinetti sono stati vaccinati verso *Mycoplasma hyopneumoniae* al 7° giorno di vita con richiamo al 21° giorno di vita e sono stati svezzati a 25 giorni di età.

Somministrazione alimentare con Micronil®
Il Micronil® è stato somministrato alle scrofe dal 55° giorno di gravidanza fino alla fine della lattazione alle dosi prescritte dalla ditta produttrice per tale prodotto (200 g/100 Kg di mangime).
Ai suinetti il Micronil® è stato somministrato con il mangime sottoscrofa messo a disposizione dopo la prima settimana di vita e poi come supplementazione nell'alimento post-svezzamento alla dose di 200 g ogni 100 Kg di mangime

Determinazione dei parametri immunitari
Ai suinetti appartenenti ai quattro gruppi è stato prelevato il sangue alla nascita (T0), 7 (T1), 14 (T2), 21 (T3), 28 (T4), 35 (T5), 42 (T6), 56 (T7) giorni di età.
Il sangue è stato consegnato al laboratorio entro 1.5-2 ore dal prelievo ed è stato immediatamente processato. Il plasma ed il siero sono stati conservati a –20°C.

Risposta linfocitaria in sangue periferico
La responsività delle cellule linfocitarie alla stimolazione *in vitro* con antigeni specifici ed aspecifici è stata valutata come produzione di IFNγ determinata mediante tecnica ELISpot e come linfoproliferazione analizzata mediante la test MTT secondo protocolli precedente descritti (Ferrari et al. 2005; Mocchegiani et al., 1998; Thacker et al., 2000). Per la produzione di IFNγ mediante tecnica ELISpot le cellule mononucleate isolate da sangue periferico [Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)] sono state stimolate in vitro con PHA (*Phytoemoagglutinin*) 0.25-0.5μg/ml (stimolazione aspecifica alla nascita, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 giorni di età) e con ceppo vaccinale P-5722-3 [6.25 MHDCE. (*M. Hyo*. DNA Cells Equivalents)] per la stimolazione specifica con *Mycoplasma hyopneumoniae* a 7 giorni di età (1a vaccinazione), a 21 (2a vaccinazione) ed a 35 giorni di età. L'analisi dell'attività metabolica e di linfoproliferazione mediante test MTT è stata ottenuta stimolando le PBMC (200.000 cellule / 100 μl di RPMI-1640) per 48 ore a 37°C in incubatore con PHA in confronto a cellule seminate unicamente in terreno di coltura. La reazione colorimetrica è stata quantificata mediante spettrofotometro con lettura di riferimento a 690 nm.
Sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico (citofluorimetria a flusso)
Per la caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie mediante citofluorimetria a flusso sono stati processati campioni di sangue periferico di suinetto, prelevati in litioeparina 5 mM per impedirne la coagulazione secondo metodiche precedentemente descritte (Borghetti et al., 2006). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD3ε-PE (PPT3), anti-CD4α-FITC (74-12-4), anti-CD8α-FITC (76-2-11) e anti-CD21-FITC (BB6-11C9.6) da Southern Biotech; anti-TcR1-N4 (PGBL22A - VMRD) + anti-IgG1-FITC (M32001 - Caltag Labs); anti-CD16-FITC (G7 - Setotec).

Esame ematologico
L'esame emocromocitometrico è stato effettuato tramite contaglobuli automatico

(*Medonic CA570 - Delcon*), specificatamente tarato per l'ematologia suina. La formula leucocitaria è stata calcolata su striscio di sangue processato mediante colorazione *May Grünwald-Giemsa* ed osservato al microscopio ottico ad ingrandimento 1000x. Le popolazioni considerate sono state: 1) leucociti (WBC : *White Blood Cells*) (valore assoluto = n° cellule /µl); 2) linfociti (valore assoluto).

Analisi statistica
L'analisi statistica è stata effettuata mediante Test *ANOVA (ANalysis Of VAriance*) per l'analisi della varianza e *Test di Tukey-Kramer* (programma SPSS v.12).

RISULTATI

Esame ematologico
I livelli di leucociti totali (n° cellule/µl) nel sangue periferico dei suinetti in esame sono apparsi alla nascita significativamente inferiori ($p<0.05$) nel gruppo 1 rispetto agli altri gruppi i quali hanno invece mostrato valori comparabili e più elevati. Fino a 28 giorni di età non sono state evidenziate modificazioni significative mentre i valori sono aumentati nelle ultime 3 settimane di indagine in maniera più evidente per il gruppo 2. I livelli assoluti di linfociti periferici, nelle prime settimane di vita, hanno mostrato un incremento progressivo per poi stabilizzarsi nel rimanente periodo di analisi; alla nascita sono state osservate differenze anche per questa popolazione, con valori assoluti più elevati per i suini del gruppo 2 ($p<0.05$).

Sottopopolazioni linfocitarie
I livelli assoluti (n° cellule/µl) di alcune sottopopolazioni linfocitarie hanno mostrato alcune differenze significative tra i gruppi, ma al tempo stesso sono apparse limitate solo ad alcune età specifiche; nel particolare, cellule a fenotipo citotossico (CD3-CD8+) e cellule a fenotipo $CD4+CD8+^{low}$ (linfociti memoria) hanno mostrato livelli più elevati nel gruppo 2 alla nascita ma alle altre età non si sono riscontrate differenze significative (dati non mostrati). Le differenze più importanti si sono osservate per i livelli assoluti dei linfociti T γ/δ nel sangue periferico (Fig. 1A): nei vari gruppi di suinetti si è osservato un progressivo incremento dei valori di tale sottopopolazione linfocitaria ed il gruppo 2 ha mostrato valori significativamente più elevati ($p<0.05$) rispetto al gruppo 4 per quasi tutto il periodo di osservazione.

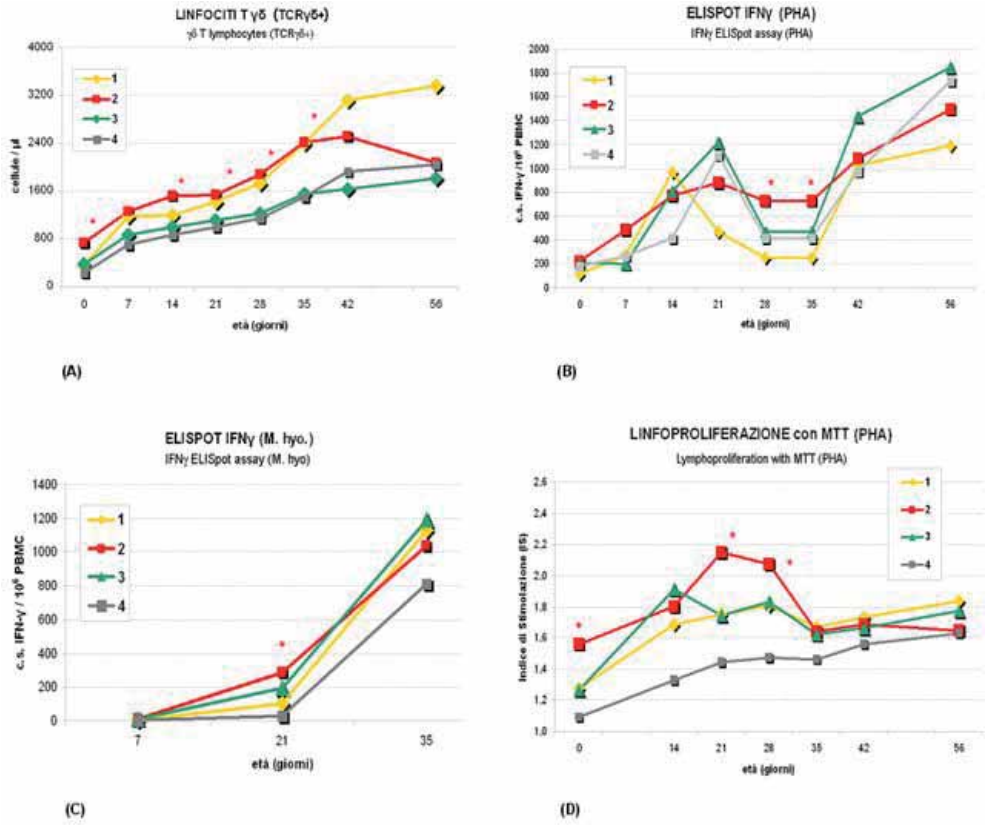


Fig. 1: ***A)*** Livelli assoluti (n° cellule/µl) di linfociti T γ/δ nel sangue periferico*;* ***B)*** Risposta cellulare in PBMC dopo stimolazione aspecifica *in vitro* con PHA valutata come cellule secernenti (c.s.) IFNγ con tecnica ELISpot; ***C)*** *R*isposta cellulare a seguito di stimolazione *in vitro* con vaccino inattivato di *Mycoplasma hyopneumoniae* valutata come n° di cellule secernenti (c.s.) *IFN*γ con tecnica ELISpot; ***D)*** Attività metabolica e capacità proliferativa dei PBMC a seguito di stimolazione con PHA valutata come indice di stimolazione (I.S.) con test MTT.

Fig. 1: ***A)*** Absolute values (nr. of cells/µl) of T γ/δ lymphocytes in the peripheral blood*;* ***B)*** Cell responsiveness after non-specific stimulation with PHA in PBMC determined as number of IFNγ secreting cells by ELISpot assay*;* ***C)*** Cell responsiveness after *in vitro* stimulation with *Mycoplasma hyopneumoniae* in PBMC determined as number of IFNγ secreting cells by ELISpot assay*;* ***D)*** Metabolic/proliferative activity of PBMC after *in vitro* stimulation with PHA (stimulation index) by MTT assay.

Risposta linfocitaria nel sangue periferico valutata come cellule secernenti (c.s.) IFNγ

Stimolazione con PHA
La risposta cellulo-mediata a seguito di stimolazione aspecifica *in vitro* con PHA è stata valutata come cellule secernenti (c.s.) IFNγ determinata con tecnica ELISpot (Fig. 1B). Alla nascita i livelli di cellule responsive sono apparsi comparabili tra i gruppi; a 14 giorni i gruppi 1, 2 e 3 sono risultati con valori medi superiori rispetto al gruppo 4 (1 vs. 4, $p<0.05$) mentre a 21 giorni il gruppo 1 è risultato avere i valori più bassi (1 vs. 3, $p<0.05$). Dallo svezzamento (25 giorni di età) fino a 35 giorni, pur nell'ambito di una risposta comunque ridotta in tutti i gruppi, il gruppo 2 ha mostrato una responsività significativamente più elevata rispetto agli altri gruppi ($p<0.05$). Nelle ultime 2 settimane si è osservato un incremento progressivo ed intenso per tutti i gruppi di suinetti ($p<0.05$).

Stimolazione con Mycoplasma hyopneumoniae
La risposta cellulo-mediata a seguito di stimolazione *in vitro* con vaccino inattivato di *Mycoplasma hyopneumoniae* è stata valutata come n° di cellule secernenti (c.s.) IFNγ con tecnica ELISpot (Fig. 1C) ha evidenziato un incremento del numero di cellule responsive dopo 2 settimane (21 giorni di età) dalla prima vaccinazione con valori significativamente maggiori nei gruppi 2 e 3 rispetto al gruppo 4. In seguito all'intenso effetto *booster* dopo 2 settimane dalla seconda vaccinazione, a 35 giorni di vita, i valori sono aumentati con valori medi che si mantengono più elevati nei gruppi 1, 2 e 3 rispetto al gruppo 4 ma senza differenza statisticamente significativa.

Attività metabolica e linfoproliferazione (MTT)
La valutazione dell'attività metabolica e della capacità proliferativa delle PBMC a seguito di stimolazione con PHA valutata con test MTT (Fig. 1D) ha evidenziato una maggior responsività nei suinetti del gruppo 2, con differenze significative rispetto al gruppo 4 alla nascita, a 21 e 28 giorni di età ($p<0,05$); nelle prime 5 settimane di vita i gruppi 1, 2 e 3 hanno manifestato una maggior risposta rispetto al gruppo 4. Nelle ultime tre settimane di indagine i valori si sono mostrati invece comparabili.

DISCUSSIONE

Un precedente lavoro sulla supplementazione con *Micronil®* nelle scrofe come additivo alimentare ha evidenziato effetti positivi sul peso e sulla omogeneità della nidiata allo svezzamento e ridotta mortalità presvezzamento (Pelenc et al., 2004). In questa prova di campo, i risultati ottenuti mettono in evidenza che tale supplementazione alimentare è in grado di influenzare alcuni parametri immunologici di tipo sistemico sia in termini di incremento numerico che di attività funzionale. Inoltre, si è riscontrato che, nell'ambito del presente studio, il trattamento che appare più efficiente nel determinismo di tali differenze rispetto agli animali controllo, è quello che prevede la supplementazione con *Micronil®* sia nelle scrofe che nei suinetti mentre il solo trattamento dei suinetti dal 10° giorno di vita all'8a settimana non si mostra in grado di determinare gli stessi effetti almeno

nelle prime due settimane di vita; questo potrebbe essere messo in relazione alla limitata assunzione del prodotto test nell'alimento nel periodo sottoscrofa, ma anche all'influenza di fattori (al momento non determinati) presenti nel latte in grado di modulare positivamente la risposta linfocitarie fin dalla nascita e nelle prime settimane di vita, momento critico per la maturazione immunitaria.
Per quanto riguarda lo studio immunologico, alcune delle differenze osservate in certi parametri immunitari, seppur statisticamente significative, appaiono di difficile interpretazione soprattutto perché appaiono limitate a specifiche età degli animali e transitorie. Viceversa, per quanto riguarda altri parametri, tali modificazioni appaiono più consistenti sia perché evidenziate per un periodo più protratto sia perché interpretabili come significato funzionale, anche in relazione ai risultati di similari ricerche riportate in letteratura. In particolare, risulta interessante l'incremento di responsività linfocitaria sia come produzione di citochine (IFNγ) ma soprattutto come incremento dell'attività proliferativa e metabolica sotto stimolo aspecifico (PHA) che è significativamente aumentata nei soggetti alimentati con *Micronil®*, rispetto agli animali controllo. Più complessa si propone l'interpretazione del riscontrato incremento della risposta cellulare Micoplasma-specifica evidente sia dopo la prima vaccinazione che dopo il *booster*. È ipotizzabile che le risposte aspecifiche e specifiche aumentate possano essere parzialmente associate se gestite dalle stesse cellule linfocitarie. In effetti, la maggior responsività linfocitaria potrebbe essere messa in relazione con i maggiori valori sistemici riscontrati nel sangue per i linfociti T γ/δ, in quanto si mostra costante per quasi tutto il periodo di osservazione nei suinetti nati da scrofe alimentate con *Micronil®* nonché da suinetti nati da scrofe trattate e poi alimentati con tale prodotto. I linfociti T γ/δ sono presenti in elevata percentuale nei giovani suinetti nel sangue fin dalla nascita (Borghetti et al., 2006) e rappresentano cellule atte a rispondere precocemente nell'ambito di una risposta innata a *challenge* di patogeni. La caratteristica fondamentale di tali cellule è che sono rappresentate in maniera importante non solo a livello del sangue ma anche a livello mucosale e soprattutto intestinale (Vega-López et al., 2001) dove, nella specie suina, rappresentano un percentuale elevata dei linfociti intraepiteliali. Inoltre, diversi lavori evidenziano che tali linfociti sono in grado di rispondere con meccanismi di riconoscimento non MHC-mediati a stimoli diversi che includono virus (Olin et al., 2004) e molecole di patogeni [PAMPs (*Pathogen Associated Patterns*)]. Tali cellule sono inoltre fondamentali fonti di produzione di IFNγ durante la risposta immunitaria innata influenzando positivamente l'attivazione di altre cellule quali NK ad azione citotossica naturale verso cellule infettate e la maturazione delle cellule dendritiche atte alla presentazione antigenica.
Si può ipotizzare che i manno-oligosaccaridi, in grado di interagire con i batteri patogeni e di modulare la microflora intestinale saprofita, possano favorire la maturazione della popolazione macrofagica e linfocitaria intestinale a livello mucosale (Davis et al., 2004) con un possibile effetto anche sistemico. In aggiunta, il β-glucano, costituente della parete di piante, batteri e funghi, è in grado, interagendo con i recettori del riconoscimento tissutale, di modulare la risposta infiammatoria and immunitaria (Dritz et al., 1995; Brown e Gordon, 2003; Wang et al., 2008). Specifici studi, hanno evidenziato che il β-glucano può stimolare la

risposta immunitaria innata e favorire una più intensa risposta immunità al virus della PRRS in quanto in grado di incrementare la produzione di IFNγ (Xiao et al., 2004); recentemente la supplementazione di β-glucano ha dimostrato effetti protettivi nei confronti di infezione da ceppi enterotossigeni di *E. coli* (Stuyven et al., 2008).

Inoltre, l'associazione simbiotica presente nel *Micronil*® tra prebiotici (manno-oligosaccaridi e β-glucano) e probiotici (fermenti lattici) potrebbe essere in grado di esaltare l'effetto positivo sia a livello locale che sistemico (Mordenti, 2005).

In conclusione, alla luce di questi preliminari risultati che evidenziano una positiva influenza sulla responsività linfocitaria dei suinetti, ne deriva l'interesse di approfondire ulteriormente le implicazioni funzionali che tale supplementazione simbiotica potrebbe avere in termini di risposta/maturazione immunologica e di *performance* di crescita. Sarebbe pertanto auspicabile incrementare le conoscenze su eventuali modificazioni qualitative e quantitative nel latte delle scrofe alimentate con *Micronil*® durante tutta la lattazione, approfondire i dati immunologici in corso di risposte immunitarie specifiche (i.e. vaccinazioni) e su modificazioni ormonali (i.e. asse GH/IGF-1) in relazione alle possibili correlazioni con dati di crescita dei suinetti. Inoltre, tali studi potrebbero fornire informazioni ulteriormente più probanti se condotte anche in presenza di infezione o comunque di scarse condizione sanitarie e di crescita.

Bibliografia

1) 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.
2) Brown G.D. e Gordon S. (2003) Fungal beta-glucans and mammalians immunity. Immunity, 19, 311-315.
3) Ferrari L., Miduri F., De Angelis E., Grazioli S., Terreni M., Cavalli V., Saleri R., Corradi A., Borghetti P., Martelli P. (2005) Caratterizzazione della tecnica ELISpot per la valutazione funzionale dell'immunità cellulo-mediata nella specie suina. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (S.I.P.A.S.), XXXI Meeting Annuale – Mantova, 345-351.
4) Davis M.E., Maxwell C.V., Erf G.F., Brown D.C., Wistuba T.J. (2004) Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune functions of weanling pigs. J. Anim. Sci., 82, 1882-1891.
5) Dritz S.S., Shi J., Kielian T.L., Goodband R.D., Nelssen J.L., Tokach M.D., Chengappa M.M., Smith J.E., Blecha F. (1995) Influence of dietary β-glucan on growth performance, nonspecific immunity and resistance to Sterptococcus suis infection in weanling pigs. J. Anim. Sci., 73, 3341-3350.
6) Kocher A. (2005) Microflora intestinale e performance dei suinetti. Suinicoltura, 7, 96-97.
7) Mocchegiani E., Corradi A., Santarelli L., Tibaldi A., DeAngelis E., Borghetti P., Bonomi A., Fabris N., Cabassi E. (1998) Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 245-260.
8) Mordenti A.L. (2005) Microflora intestinale e salute. Large Animals Reviews, 11, 21-31.
9) 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 Immunol, 18, 490-499.
10) Pelenc F., Delporte I., Jouglar J.Y. (2004) Effect of feeding supplementation with MICRONIL® on sow performance and behaviour. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2, 880-881.
11) Stuyven E., Cox E., Vancaeneghem S., Arnouts S., Deprez P., Goddeeris B.M. (2008) Effects of β-glucans on a ETEC infection in piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. (in press).
12) Thacker E.L., Thacker B.J., Kuhn M., Hawkins P.A., Waters W.R. (2000) Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a Mycoplasma hyopneumoniae bacterin to pigs. Am. J. Vet. Res., 61, 1384-1389.
13) Xiao Z., Trincado C.A., Murtaugh M.P. (2004) β-Glucan enhancement of T cell IFNγ response in swine. Vet. Immunol. Immunopathol., 102, 315-320.

14) Vega-López M.A., Arenas-Contreras G., Bailey M., Gonzalez-Pozos S., Stokes C.R., Ortega M.G., Mondragon-Flores R. (2001) Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. Dev. Immunol., 8, 147-158.
15) Wang Z., Shao Y., Guo Y., Yuan J. (2008) Enhancement of peripheral blood CD8+ T cells ad classical Swine Fever antibodies by dietary β-1,3/1,6 glucan supplementation in weane piglets. Transbound. Emerg. Dis., 55, 369-376.

MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI DA PCV2 NEGLI ALLEVAMENTI PIEMONTESI: DALLA DIAGNOSI ALLA CARATTERIZZAZIONE DEI FENOTIPI ISTOLOGICI

MONITORING OF PCV2 INFECTIONS IN PIEDMONT FARMS: FROM DIAGNOSIS TO THE CHATACTERIZATION OF HYSTOLOGICAL PHENOTYPES

ELENA BOZZETTA, KATIA VARELLO, CHIARA MUSELLA, MARIA ELENA CAREDDU, GIULIANO PISONI(1), FABIO ZUCCON, RICCARDO MADONNA (2), MARCO MONTESANO (2), MARCO FACCENDA (2), FRANCO KOBAL (2), VITTORIO SALA(1)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
(1) Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Università degli Studi di Milano
(2) Medico Veterinario libero professionista

Parole chiave: suino, PCV2, grading istopatologico .

Key words: swine, PCV2, histo-pathological grading.

Riassunto. Istopatologia e immunoistochimica, eseguite su panel di organi prelevati dalle mortalità aziendali giornaliere, sono strumenti fondamentali per una diagnosi certa di PCVD. L'applicazione di questo sistema in cinque allevamenti della regione Piemonte ha consentito di verificare l'applicabilità di un grading istologico alle lesioni rilevate. La correlazione tra il grading e l'esame immunoistochimico è stata osservata nella maggior parte delle lesioni classificate con grado 2-3 di deplezione e 1-2 di flogosi, mentre le lesioni classificate con deplezione 1 sono state più spesso negative all'IHC. Inoltre non si sono riscontrate positività IHC in assenza di lesioni caratteristiche, anche quando il virus è presente perché altamente circolante.

Summary. Histopathology and immunoistochemistry tests performed on a panel withdrawn from daily farm mortalities are fundamental tools for the diagnosis of PCVD. The application of this system in five farms of the Piedmont region has allowed verifying the reliability of a histological grading. The correlation between grading and IHC has been observed in lesions classified with degree 2-3 of depletion and 1-2 of inflammation, while the lesions classified with depletion 1 have been more often negative to the IHC. Moreover, IHC positivity has not been found without lesions, also when highly circulating virus is present.

INTRODUZIONE

Le infezioni da PCV2 sono responsabili di un gruppo di sindromi, da tempo conosciute come Porcine Circovirus Diseases (PCVDs), e tra queste la Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) può essere considerata quella clinicamente

più importante; la sua diffusione in tutti i sistemi suinicoli del mondo, dal 1999 in poi, ha rappresentato solo l'emersione di un problema latente da molti anni, come hanno confermato le indagini sierologiche retrospettive.
Nella diagnosi di PMWS, l'associazione della sintomatologia e delle lesioni con quantità indicative di PCV2 o del suo acido nucleico è una discriminante essenziale, mentre i criteri per l'identificazione della PCVD sono ancora incerti; alcuni allevamenti possono avere mortalità individuali occasionali, spesso epidemiologicamente inspiegabili, che tuttavia ricordano molto quanto si osservava, pur in assenza di certezze diagnostiche, prima dell'emergenza PMWS.
Per definirne le caratteristiche, il consorzio europeo per le malattie da circovirus tipo 2, ha dato alcune precise indicazioni: una di queste è l'aumento inatteso della quota mortalità di almeno 1,66 x 2 volte la deviazione standard per un periodo di almeno due mesi, rispetto ai tre mesi immediatamente precedenti, utilizzati come riferimento storico aziendale; per la conferma anatomo-istopatologica, è necessario eseguire l'esame necroscopico su animali morti di recente o all'uopo sacrificati (cinque soggetti è la soluzione ottimale): la diagnosi è positiva solo se si trovano tutte le lesioni tipiche in almeno uno dei suini.
Le alterazioni indicative sono linfoadenopatia inguinale, enterite, polmonite e ittero a livello macroscopico, deplezione linfocitaria e infiltrazione istiocitaria del tessuto linfoide, corpi inclusi e cellule giganti a livello istopatologico; l'evidenziazione immunoistochimica o biomolecolare di PCV2 conferma la diagnosi.
L'obiettivo di accertare l'effettiva rilevanza delle infezioni da PCV2 negli insediamenti suinicoli piemontesi, e in particolare in quelli del cuneese, ha motivato la costituzione di un gruppo di lavoro che ha coinvolto l' Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (sede centrale di Torino e sezione territoriale di Cuneo), la sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell''Università di Milano e alcuni suiatri operanti nei territori interessati dalle indagini; i primi risultati della collaborazione, tuttora in corso, sono riportati in questa breve nota .

MATERIALI E METODI

Allevamenti e campionamento

Il protocollo d'intervento è stato comunicato a un gruppo di veterinari pratici nel corso di una riunione preliminare nel mese di aprile 2008; lo stesso ha previsto la selezione degli allevamenti sulla base delle indicazioni del progetto di ricerca europea "Control of Porcine Circovirus Diseases (PCVDs): Towards Improved Food Quality and Safety", basate su rilievi epidemiologici temporizzati in ambito aziendale e campionamenti delle mortalità per gli accertamenti diagnostici.
L'idoneità delle aziende proposte dai veterinari aderenti è stata verificata mediante un sopralluogo iniziale, durante il quale sono state verificati i dati produttivi, con particolare riguardo alla fase di svezzamento, nonché prelevati campioni ematici a venti suinetti appartenenti a gruppi con evidenti manifestazioni di deperimento progressivo; sono state inoltre eseguite le necroscopie degli svezzati morti nelle ultime 24 ore e date le indicazioni per il conferimento di altri soggetti nel caso che il numero esaminato fosse minore di cinque.

Per ogni allevamento è stata compilata una scheda segnaletica, allo scopo di identificare i fattori di rischio epidemiologico nel management aziendale; il campionamento ha interessato polmoni, tonsille, linfonodi tracheo-bronchiali, milza e linfonodi inguinali; i prelievi sono stati divisi in parti uguali: una è stata immediatamente fissata in formalina tamponata al 10% per l'esame istopatologico e l'altra refrigerata in contenitori separati per le indagini di biologia molecolare (PCR), che sono state eseguite anche nei confronti di PRRSV, allo scopo di verificarne la presenza, come unico agente eziologico o in concomitanza con PCV2.
La presenza di lesioni indicative di patologie coesistenti o di complicanza ha attivato tutti gli accertamenti diagnostici necessari a stabilirne l'effettiva causa.
Le caratteristiche salienti delle aziende considerate fino ad oggi sono riassunte in tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche delle aziende esaminate.

N. progressivo	Ciclo	N. scrofe	Età svezz. (giorni)	Durata svezz.
1	Chiuso completo (mono-sito)	400	28	50
2	Chiuso completo (tre siti)	1.600	25	30
3	Aperto (mono-sito)	160	28	60
4	Aperto (mono-sito)	600	25	30
5	Chiuso completo (tre siti)	1.500	21	40

Esame istologico
I campioni sono stati ridotti, processati e inclusi in paraffina; si è poi proceduto al taglio microscopico su piani differenti di sezioni seriali di 4±2µ di spessore, destinate alla colorazione con ematossilina ed eosina (EE) e all'esame immunoistochimico (IHC) per il rilievo di PCV2; presenza e gravità delle lesioni indicative di PCV2 nelle sezioni colorate con EE hanno determinato l'attribuzione di un punteggio, secondo lo schema proposto da Opriessnig & coll. (2007).
Secondo tale schema, la presenza di flogosi istiocitaria e/o granulomatosa nel tessuto linfoide e la deplezione del tessuto linfatico comportano l'attribuzione di punteggi da 0 a 3, mentre nel polmone la flogosi interstiziale granulomatosa, l'iperplasia del tessuto linfoide peribronchiolare e la presenza di essudato alveolare sono quantificate con valori da 0 a 6.
Colorazione IHC per PCV2
Dopo lo sparaffinamento e la reidratazione delle sezioni, si è proceduto allo smascheramento antigenico incubando i vetrini per 15 minuti a 37°C in una soluzione di proteasi allo 0,07%; il blocco delle perossidasi endogene è stato ottenuto immergendo i preparati in una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo.
I vetrini sono stati ricoperti con sieroalbumina bovina (BSA) 5% e messi a incubare in camera umida a temperatura ambiente per 30 minuti al fine di saturare eventuali legami aspecifici; successivamente, le sezioni di ogni campione e del controllo positivo sono state incubate in camera umida con il siero monoclonale anti-PCV2 (Ingenansa, Spagna) diluito 1:200 in PBS pH 7.3 per 60 minuti a temperatura ambiente.

Al termine dell'incubazione, i vetrini, dopo due lavaggi in PBS per 4 minuti ciascuno, sono stati ricoperti con l'anticorpo secondario fornito dal ChemMate™ Dako Envision™ Detection Kit Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse e posti ad incubare per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente; il legame dell'anticorpo secondario è stato evidenziato attraverso l'incubazione finale con la soluzione cromogena di 3,3-diaminobenzidina (DAB). I vetrini sono stati infine controcolorati con Emallume acido di Mayer.
Le sezioni sono poi state esaminate al microscopio ottico a ingrandimenti 4, 10, 20 e 40x e valutati come positivi in base alla presenza di precipitati bruni presenti nelle cellule dendritiche follicolari e nell'infiltrato infiammatorio mononucleare e gigantocellulare; l'idoneità della reazione è stata valutata per confronto con campioni di linfonodo suino (positivo e negativo) provenienti da infezione sperimentale e precedentemente testati per PCV2.
Polymerase Chain Reaction
Il DNA è stato estratto da 25 mg di tessuto mediante l'utilizzo del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Milano, Italy).
Per la diagnosi di PCV-2 sul DNA estratto è stata eseguita una PCR con i primers PCV2f ATGACGTATCCAAGGAGGCG e PCV2r GGATATTGTAGTCCTGGTCG che amplificano un frammento di 620bp corrispondente alla regione ORF2 di PCV-2; il protocollo di amplificazione prevede 35 cicli di amplificazione a 95°C per 50s, 58°C per 50s, e 72°C per 60s.
L'RNA è stato estratto da da 25 mg di tessuto mediante l'utilizzo di Trizol (Invitrogen, Milano, Italy) e successivamente è stato retrotrascritto con primers random in cDNA mediante l'utilizzo del kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Milano, Italy). Per la diagnosi di PRRSV sul cDNA è stata eseguita una PCR con i primers PRRSf GCCCCTGCCCAICACG e PRRSr TCGCCCTAATTGAATAGGTGA descritti in Oleksiewicz et al. (1998) che amplificano un frammento di circa 640bp della regione ORF7 di PRRSV (American-type e European-type); il protocollo di amplificazione prevede 40 cicli di amplificazione a 95°C per 40s, 60°C per 40s, e 72°C per 60s.
I prodotti di PCR sono stati successivamente analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio e marcatura con etidio bromuro.

Risultati e considerazioni
La tabella 2 riporta i risultati delle diagnosi eseguite sul materiale prelevato durante le necroscopie eseguite nei cinque allevamenti; in proposito, proponiamo qui di seguito descritti.
Azienda 1. Il grading delle lesioni ha mostrato punteggi compresi tra 0 e 1, sia per il tessuto linfoide, sia per il polmone, nel quale sono state però rilevate lesioni piogranulomatose, multifocali. L'esame immunoistochimico e PCR sono risultati negativi su tutti i campioni.
Azienda 2. sui cinque soggetti campionati, due hanno presentato lesioni compatibili con PCV2, associate a positività immunoistochimica e in PCR di tutti gli organi esaminati; in questi animali, il grading ha indicato lesioni tra 1 e 3 per la deplezione e tra 1 e 2 per l'infiltrazione istiocitaria. Per quelle polmonari, il valore rilevato è stato tra 3 e 4, con positività immunoistochimica ed alla PCR in due soggetti.
In un suinetto con lesioni compatibili, la positività immunoistochimica e PCR ha

interessato solo alcuni organi linfoidi, ma non il polmone. Nei due animali restanti, l'IHC è risultata sempre negativa, mentre la PCR positiva solo in alcuni organi di uno di essi.
Azienda 3. sui quattro soggetti esaminati, solo uno ha mostrato in tutti gli organi lesioni compatibili, associate a positività immunoistochimica e PCR; gli altri tre hanno presentato lesioni compatibili, ma IHC e PCR solo su alcuni organi.
Nei soggetti positivi il grading ha indicato lesioni tra 1 e 3 per la deplezione e tra 1 e 2 per l'infiltrazione istiocitaria; per il polmone era tra 2 e 4, con positività immunoistochimica ed alla PCR in tre soggetti.
Azienda 4. Solo un soggetto dei cinque campionati ha presentato lesioni compatibili in tutti gli organi, associate a positività immunoistochimica e PCR, che nei suini restanti hanno interessato solo alcuni organi; il grading ha indicato lesioni tra 2 e 3 per la deplezione, e pari a 2 per l'infiltrazione istiocitaria. Per il polmone il grading è stato compreso tra 0 e 4, con positività immunoistochimica in un soggetto e in due alla PCR.
Azienda 5. Le lesioni riscontrate sono state scarsamente indicative di un'infezione da PCV2, come hanno confermato i punteggi di grading tra 0 e 1 del tessuto linfoide; nel polmone è stato possibile rilevare lesioni piogranulomatose da multifocali a diffuse. L'esame immunoistochimico è risultato negativo su tutti i campioni in accordo con i risultati della PCR.
In tutti i soggetti è stata rilevata una diffusa positività alla PRRS in PCR.

Discussione

La caratterizzazione epidemiologica e clinica aziendale delle malattie da PCV2 (PCVDs) è spesso condizionata da diverse variabili strutturali e manageriali, che la rendono di difficile comprensione; in queste situazioni, la diagnosi si basa più sulla interpretazione che sul dato oggettivo, che si può ottenere solo con un intervento, correttamente gestito, del laboratorio.
Alla fine, un approccio diagnostico corretto alle patologie da PCV2, e alla PMWS in particolare, presenta problemi organizzativi, spesso difficilmente gestibili; l'indispensabilità della dimostrazione su base istologica dell'associazione lesione-virus è ormai un fatto generalmente accettato e, in questa prospettiva, correttezza analitica del dato anamnestico, qualità del campionamento e completezza dell'esame istologico sono passaggi decisivi, ma anche assai impegnativi. In ogni caso, il percorso diagnostico non dovrebbe considerarsi conclusivo con il solo esame istologico mediante colorazione con ematossilina-eosina, poiché i corpi inclusi indicativi della presenza dell'agente sono difficilmente riscontrabili nelle lesioni. (Sarli et al., 2008).
Di conseguenza, è ancora molto diffuso, perché più semplice, l'impiego della sierologia o della ricerca del genoma virale mediante PCR, che però, non potendo dimostrare la presenza delle lesioni, non ha un valore decisivo; in altri casi, invece, è disponibile l'esame istologico, ma manca la dimostrazione della presenza di PCV2.
In generale, tessuto linfoide e polmone rappresentano i materiali diagnostici più affidabili: tuttavia, la corrispondenza tra le lesioni istopatologiche indicative e la positività immunoistochimica per PCV2 è molto più elevata per il primo rispetto al secondo (Sarli et al., 2007). Anche in questo caso, infatti, si è riscontrata una situazione sovrapponibile, a lesioni anche gravi (classificate con valori da 4 a 6) non sempre è corrisposta positività per PCV2 all'IHC ed anche alla PCR. In particolare

si è potuto notare come tra gli elementi presi in considerazione per la valutazione del polmone quello che si è dimostrato più indicativo d'infezione è la proliferazione del tessuto linfoide peribronchiale. Infatti, nei campioni di tessuto polmonare risultati positivi all'esame immunoistochimico questo reperto era sempre riscontrabile. Altre lesioni quali la polmonite interstiziale o l'iperplasia dei setti alveolari sembrano invece anche correlabili alle infezioni concomitanti, come dimostra la frequenza del reperto di PRRSV.

Nel tessuto linfoide, l'elemento più frequentemente riscontrato è stata la deplezione linfocitaria di gravità variabile fino alla perdita della struttura follicolare; la flogosi associata si presentava da lieve a moderata, ma contrariamente a quanto descritto in letteratura, non sono state evidenziate lesioni granulomatose con completa sostituzione del follicolo e presenza di cellule multinucleate. Va inoltre rilevato che nei campioni analizzati finora non sono stati evidenziati corpi inclusi in accordo con quanto precedentemente segnalato da Sarli et al (2008)

Per quanto riguarda la relazione tra il grading e l'esame immunoistochimico si può evincere che la positività è stata riscontrata nella maggior parte delle lesioni classificate con grado 2-3 di deplezione e 1-2 di flogosi, mentre le lesioni classificate con 1 per la deplezione hanno presentato più frequentemente negatività immunoistochimica, in accordo con quanto descritto da Luppi et al (2004). Inoltre non si sono riscontrate positività immunoistochimiche in campioni con assenza di lesioni caratteristiche seppure ne sia possibile in alcuni soggetti dimostrare la presenza del virus (Sarli et al 2008) a causa della ormai nota diffusione del virus nella popolazione. (Allan et al 2000)

Per finire, ci pare opportuno rilevare come l'attribuzione di un "grading" alle lesioni istopatologiche possa rappresentare, oltre e insieme alla valutazione immunoistochimica, un contributo alla correttezza delle interpretazioni e quindi alla completezza diagnostica; la correlazione delle osservazioni diagnostiche con le caratteristiche strutturali e manageriali delle aziende non è al momento possibile, visto il numero ridotto di verifiche, ma costituisce uno degli obiettivi del lavoro.

Resta inoltre aperto il quesito riguardante la presenza concomitante dei due virus immunocondizionanti (PRRSV e PCV2) nelle sindromi di svezzamento; perciò, l'estensione delle valutazioni ad altri allevamenti e l'integrazione dei prelievi diagnostici, considerando anche una comparazione "evolutiva" delle lesioni in gruppi sperimentali appositamente selezionati (lavoro già in corso) potrà ulteriormente dare indicazioni al riguardo.

Tabella 2. Grading istologico, risultati immunoistochimici e biomolecolari
Legenda: il primo numero (a) indica la deplezione linfocitaria, il secondo (b) la flogosi granulomatosa es. a/b. N.d. = campioni autolitici

Table 2. Histopathological grading, immunohistochemical and molecular results
Explanation: first number (a) show lymphoid depletion, the second (b) show granulomatous inflammation e. g.: a/b. N.d. = autholitic samples

▶

ALLEVAMENTO		GRADING ISTOLOGICO						IHC/PCR					
	Soggetto	Polmone	Tonsilla	Linfonodo tracheo-bronchiale	Milza	Ileo	Linfonodo inguinale	Polmone	Tonsilla	Linfonodo tracheo-bronchiale	Milza	Ileo	Linfonodo inguinale
1	1	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	2	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	3	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	5	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
2	1	3	/	1/0	/	/	1/0	Neg/Neg	/	Neg/Neg	/	/	Neg/Neg
	2	3	2/2	2/2	2/0	1/0	2/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	3	4	3/1	3/2	2/0	2/1	3/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	4	4	2/2	2/0	2/0	2/1	1/0	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos
	5	4	Nd	1/0	2/0	2/1	1/0	Neg/Neg	Neg/Pos	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Pos	Neg/Pos
3	1	4	2/0	2/0	2/0	1/0	2/0	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	2	2	Nd	2/1	2/0	1/0	3/1	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Neg	Pos/Pos
	3	1	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	4	Nd	2/1	2/0	1/0	3/1	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos
4	1	4	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
	2	2	3/2	3/2	3/2	Nd	1/0	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos	Neg/Pos
	3	1	3/2	3/2	2/2	Nd	3/2	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Neg	Neg/Pos	Neg/Neg
	4	3	3/2	3/2	3/2	3/2	2/2	Neg/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	Pos/Pos
5	1	6	1/0	1/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	2	4	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	3	4	0/0	0/0	0/0	1/0	0/1	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	4	4	0/0	0/0	0/0	Nd	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
	5	4	0/0	0/0	Nd	Nd	0/0	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg

Tabella 3. Evidenze diagnostiche per PCV2 e PRRSV nelle aziende considerate.

	Istopat.	IHC	PCR
Azienda 1			
PCV2	Negativa	Negativa	Negativa
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 2			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 3			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 4			
PCV2	Positiva	Positiva	Positiva
PRRSV	=	=	Positiva
Azienda 5			
PCV2	Negativa	Negativa	Negativa
PRRSV	=	=	Positiva

Bibliografia

Allan G.M., Ellis E.J.: 2000, Porcine circoviruses: a review. J Vet Diagn Invest 12:3–14
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 Veteri¬nary Journal, 169. 326-336.
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 del 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 cli-nico 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-istopatologi-ci e virologici in un allevamento del Nord-Italia. Atti SIPAS XXVII. 169-178.
Sala G., Rigola S., Alberali G.L., Brocchi E., Cordioli P. (2000) Development of monoclonal antibodies based ELISAs for thè detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. Proceeding of thè 5th International Congress of thè European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 253-254.
Opriessnig T., Thacker E.L., Yu S., Fenaux M., Meng X.-J., Halbur P.G.: 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet Pathol 41:624–640.
Sarli G., Ostanello F, Morandi F., Nigrelli A., Alberali L., Dottori M., Vezzoli F, Barigazzi G., Sala. V, Leotti G. (2007) "Applicazione di un protocollo per la diagnosi di PMWS". Atti del¬la Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. XXXIII Meeting Annuale 189-202.

IL TUO PARTNER IN TERAPIA VETERINARIA E NUTRIZIONE

chemifarma® S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47100 Forlì (Italy)
Tel. +39 **0543 796464** - Fax +39 **0543 796479**
e-mail: info@chemifarma.it - **www.chemifarma.it**

ESPERIENZA DI CAMPO SULL'IMPIEGO DI TULATROMICINA NEL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI GLÄSSER DEL MAIALE

IN FIELD EVALUATION OF THE USE OF TULATHROMICYN FOR GLÄSSER DISEASE CONTROL IN PIG

ANTONIO CALEFFI
Medico Veterinario, Mantova

Parole chiave: Malattia di Glässer, *H. parasuis*, Tulatromicina

Key words: Glässer disease; *H. parasuis*, Tulathromicyn

Riassunto. Il caso descritto ha interessato un allevamento a ciclo chiuso di circa 500 scrofe situato nel nord Italia che nel settore svezzamento soffriva delle problematiche connesse con le infezioni da PRRSV, *E. coli* di ceppo ETEC, e S. *suis* tipo 2. Tutte le strategie terapeutiche e di profilassi impostate erano quindi mirate al controllo di detti patogeni. Nella seconda metà del febbraio 2006 la mortalità nella fase di svezzamento ebbe un repentino aumento, e sulla base degli accertamenti anatomopatologici e microbiologici venne formulata la diagnosi di Malattia di Glässer. La strategia metafilattica ha previsto l'introduzione di Draxxin (tulatromicina) iniettabile. A seguito del protocollo applicato la mortalità nei gruppi trattati con l'iniezione di tulatromicina rientrò immediatamente negli standard abituali dell'allevamento. Dopo qualche mese vista la scomparsa della fenomenologia clinica e la riduzione della mortalità riconducibile alla Malattia di Glässer il trattamento con tulatromicina venne sospeso. Già il primo lotto di suinetti non trattato presentò un aumento della mortalità che gli accertamenti diagnostici hanno permesso di ascrivere alla malattia conseguente all'infezione da H parasuis. La reintroduzione del trattamento metafilattico con Draxxin ha garantito, di nuovo, una riduzione della mortalità a seguito della scomparsa della fenomenologia clinica riferibile alla Malattia di Glässer.

Summary. The case reported occurred in a farrow to finish 500 sows herd, located Northern Italy. During the post-weaning period piglets suffered from diseases correlated to infections by PRRSV, E.coli strain ETEC, and *S.suis* type 2. All therapeutic and prophylaxis strategies planned were specific to control these pathogenics. On second half of February 2006, mortality in the nursery period suddenly rose and, according to pathological and microbiologic findings, a diagnosis of Glässer's Disease was formulated. The metaphylactic strategy to combat this situation was based on Draxxin (tulathromicyn) injection. After the introduction of tulathromicyn injection mortality felt down to the percentage recorded before the onset of the first episode of Glässer Disease. After some months, because of the disappearance of the clinical signs and the reduction of mortality, the metaphylactic treatment with tulathromicyn was kept out. Promptly, just in the first untreated piglets stock mortality increased and diagnostic examinations have been demonstrated to be a consequence of H parasuis infection. The reintroduction of metaphylactic treatment with Draxxin guaranteed, again, the reduction of mortality and the clinic signs referred to Glässer's Disease disappeared.

INTRODUZIONE

La Malattia di Glässer, espressione clinica del *H parasuis*, era sino a qualche anno fa considerata una patologia dei suinetti e degli animali in accrescimento, anche riproduttori ad inizio carriera, con incidenza sporadica. Oggi, probabilmente anche a seguito della comparsa di virus che sistematicamente colpiscono i settori di svezzamento, la gravità e la frequenza con cui viene registrata la malattia conseguente all'infezione da *H. parasuis* è senza dubbio aumentata in modo significativo. Nel caso clinico descritto nella presente nota si deve sottolineare che l'allevamento era positivo per PRRSV e PCV2 in tempi precedenti alla comparsa del primo grave episodio di M. di Glässer, quindi l'insorgenza della patologia è probabilmente da imputarsi a qualche altra causa, come ad esempio l'arrivo di un nuovo sierotipo o di un possibile calo dell'immunità colostrale. Per il controllo di questa malattia si è scelto di utilizzare la tulatromicina un nuovo macrolide appartenete alla famiglia dei triamilidi, caratterizzato dalla capacità di avere una lunga attività con un solo intervento, quindi l'ideale per gli interventi di metafilassi ed inoltre dotato di un ampio spettro di attività verso i più importanti patogeni dell'apparato respiratorio.

MATERIALI E METODI

L'esperienza descritta in questo caso ha interessato un allevamento di 500 scrofe a ciclo chiuso ubicato nella provincia di Mantova, dotato di infrastrutture non di recente realizzazione e gestito in flusso continuo nei settori di magronaggio e ingrasso. Solo nei settori di sala parto e svezzamento veniva rigorosamente applicato il tutto pieno, tutto vuoto. Dal punto di vista sanitario l'azienda era PRRS positiva e nel settore svezzamento erano presenti problemi correlati all'infezione da *S.suis* tipo 2 e da *E. coli* di ceppo ETEC. L'efficienza riproduttiva era considerata buona (24 svezzati/scrofa/anno) con AMG di 650 gr. sino a 160 kg. Per il controllo dei due patogeni le strategie di metafilassi erano basate rispettivamente sull'utilizzo di amoxicillina somministrata sia per via parenterale il giorno dello svezzamento che per os attraverso il mangime e sulla somministrazione di colistina solfato.
La mortalità nella fase di svezzamento si attestava mediamente su valori oscillanti tra il 5 e il 6 %. A partire dal lotto svezzato a fine febbraio, la mortalità subì un incremento improvviso per raggiungere anche il 23% mantenendosi oltre il 17% per i 5 lotti di svezzamento successivi. La diagnosi formulata dopo l'esecuzione dell'esame anatomopatologico svolto in allevamento fu di Malattia di Glässer, sospetto confermato dalle evidenze di laboratorio che hanno dimostrato la presenza di *H. parasuis* mediante tecnica PCR. Tale rilievo non è stato confermato dall'isolamento per le note difficoltà alla crescita che il patogeno presenta. Inoltre, i campioni analizzati risultavano positivi anche a PRRSV. *H parasuis* viene considerato come uno "slow killer" ma in alcune circostanze è in grado di comportarsi come un patogeno a rapida e letale evoluzione, in grado di determinare danni di considerevole entità e di assoluto rilievo economico, soprattutto nei casi in cui i suinetti in fase di svezzamento possiedono un corredo immunitario non uniforme. In tema di metafilassi, soprattutto nelle malattie che insistono nel periodo post-svezzamento risulta indispensabile ricorrere ad un trattamento parenterale in quanto la medicazione attraverso l'alimen-

to spesso non garantisce il raggiungimento dei livelli di antibatterico nella biofase utili al perseguimento dell'obiettivo di contrasto dell'infezione. In effetti, rispettando i dosaggi di inclusione nel mangime previsti per le premiscele, si dovrebbero realizzare livelli di ingestioni di mangime molto elevati che, soprattutto nelle prime fasi del periodo post svezzamento sono di difficile ottenimento, soprattutto nei soggetti che non hanno raggiunto un peso ottimale, stimati, di norma, in non meno dell'8-10% degli svezzati. Saranno questi soggetti che più facilmente ammaleranno. Ovviamente la scelta del principio attivo da somministrare allo svezzamento, dovrà essere il più possibile mirato al patogeno che con maggior frequenza è responsabile dei problemi della fase stessa, e magari di effetto prolungato con un solo intervento in modo da ridurre il numero delle manualità necessarie per garantire la compliance relativa a quella molecola, obiettivo prioritario per il conseguimento dell'effetto antibatterico.
Nel caso oggetto della presente nota, la strategia di metafilassi applicata con la medicazione nell'alimento si rivelò inefficace tanto che, alla luce delle evidenze cliniche e della mortalità registrata, si impose la necessità di introdurre l'utilizzo della tulatromicina, a partire dal lotto svezzato l'ultima settimana di marzo. Il protocollo prevedeva un doppio trattamento da compiersi il giorno dello svezzamento e dopo 7 giorni, utilizzando il dosaggio previsto dalle indicazioni cioè 1 ml per 40 kg di p.v., in pratica 0,2 ml per suinetto.
Nel contempo venne pianificato il passaggio della gestione aziendale da un sistema settimanale a uno tri settimanale questo per ottenere una gestione TPTV anche nei settori di magronaggio.

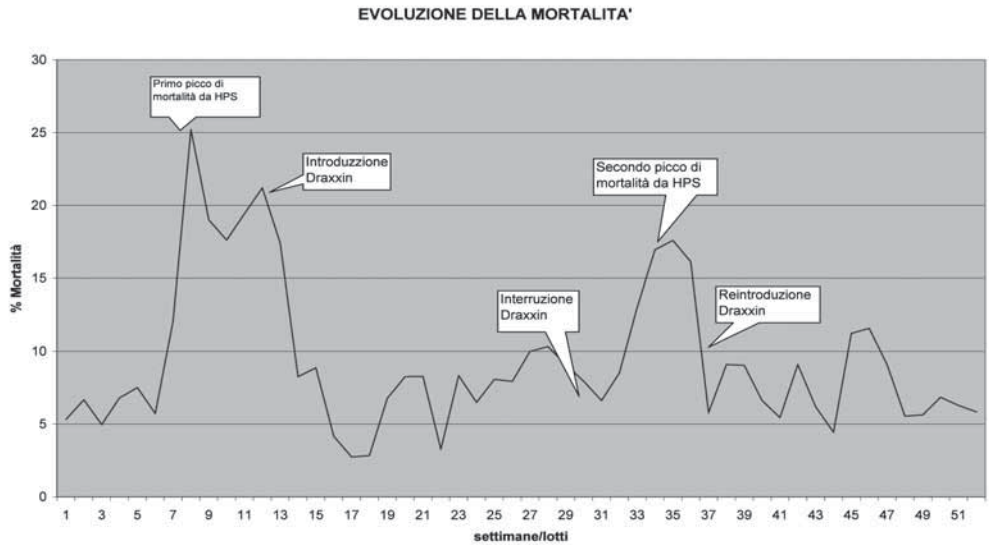
RISULTATI

Dal primo lotto trattato con il nuovo protocollo le perdite si attestarono su valori simili a quelle dei periodi precedenti all'episodio di Malattia di Glässer. Nel lotto della prima settimana di aprile la mortalità risultò dell'8.3% e in quello della prima settimana di maggio del 2.8%. L'evoluzione della mortalità è riportata nella figura n. 1. La ricomparsa di problemi riferibili all'infezione da *Streptococcus suis* registrati all'inizio del mese di agosto imposero la decisione di reintrodurre l'impiego di amoxicillina L.A in sostituzione della tulatromicina. Nell'arco di due settimane dalla sospensione dell'impiego di tulatromicina in regime di metafilassi i suinetti svezzati ricominciarono ad avere una mortalità decisamente più elevata, 13% la 3° settimana di agosto e 17.6% la 4°. Anche in questo caso l'aumento della mortalità si associò alla ricomparsa della Malattia di Glässer in base a quanto confermato dagli accertamenti di laboratorio che permisero di evidenziare la presenza di *H. parasuis*. In questo caso, l'isolamento di H. *parasuis* permise di eseguire l'antibiogramma dal quale emerse una sensibilità spiccata alla tulatromicina. La reintroduzione del protocollo basato sul doppio trattamento con Draxxin a partire dalla 2° settimana di Settembre permise di ottenere una riduzione della mortalità già a partire dal primo lotto che si attestò sui livelli abituali per rimanervi sino alla fine dell'anno.
Un'analisi complessiva dei dati relativi alla mortalità permette di segnalare che i lotti trattati con il vecchio protocollo e colpiti dalla Malattia di Glässer hanno fatto regi-

strare perdite media del 18.3% mentre quelli sottoposti a trattamento metafilattico con Draxxin la mortalità è stata del 7.3%. Inoltre si segnala che al risultato positivo in termini numerici per riduzione delle perdite a vantaggio dei lotti trattati con tulatromicina si deve aggiungere il miglioramento delle performance zootecniche in relazione ai migliori incrementi ponderali e omogeneità dei gruppi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dal punto di vista della discussione sottolineerei che la diagnosi clinica della M. di Glässer non è difficile ma richiede di effettuare almeno la diagnosi differenziale con la poliartrite da *S. suis*, ciò non toglie che dal punto di vista anatomo patologico il rischio di sbagliare diagnosi è decisamente più basso, quindi per ridurre gli errori è sempre consigliabile effettuare delle autopsie in campo che facilitano la diagnosi corretta. Dal punto di vista del laboratorio tra l'altro *H parasuis* non è di facile isolamento come, infatti, è accaduto in questo caso durante il primo focolaio, e anche se la tecnica PCR ci viene in aiuto per la diagnosi eziologica poi purtroppo questo metodo non ci permette di effettuare un antibiogramma. Voglio inoltre ricordare che al tempo di questo episodio il Draxxin in Italia non aveva ancora ottenuto la registrazione per il controllo di H. *parasuis*, ma fortunatamente questo non è stato un limite al suo utilizzo. Oggi l'allevamento pratica un singolo intervento di Draxxin 7 giorni dopo lo svezzamento. In conclusione l'allevamento è stato in grado di ottenere un'importantissima riduzione del danno causato dall'insorgere di una nuova malattia che ha colpito il settore svezzamento grazie al corretto percorso diagnostico e all'applicazione di misure di profilassi mirate che sono indubbiamente legate all'efficacia che la tulatromicina ha dimostrato di esprimere nei confronti di *H. parasuis*.



Bibliografia

1) Brockemeier, S., Lager, K. & Palmer, M. (2002). Interactions among porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Bordetella bronchiseptica and Haemophilus parasuis in swine respiratory disease. Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, Volume 1, p. 276.
2) Martin de la Fuente, A., Tuker, A., Navas, J., Blanco, M., Morris, S. & Gutierrez-Martin, C. (2007). Antimicrobial susceptibility patterns of Haemophilus parasuis from pigs in the United Kingdom and Spain. Veterinary Microbiology 120, 184-191.
3) Oliveira, S.,Blachcall, P.J. & Pijoan, C. (2003)Role of Haemophilus parasuis in nursery mortality. Proceding of the Allen D. Leman swine Conference, p.111.

RICOSTRUZIONE CHIRUGICA FUNZIONALE IN SCROFA COLPITA DA MORSICATURA DELLA VULVA DURANTE LA LATTAZIONE

SURGICAL AND FUNCTIONAL SURGERY IN A LACTATING SOW AFFECTED BY VULVA BITING

PAOLO CANDOTTI[1], SARA ROTA NODARI[1]

[1]***Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale, stituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia***
email: paolo.candotti@bs.izs.it

Parole chiave: morsicatura della vulva, scrofa, gabbia parto, benessere, chirurgia

Key words: vulva biting, sow, farrowing crate, welfare, surgery

Riassunto. In un allevamento a ciclo chiuso di 300 scrofe, una scrofa granparentale di razza Large White in sala parto è stata colpita da cannibalismo della vulva da parte dei suinetti. Le lesioni dovute al cannibalismo avevano determinato una alterazione anatomica che consisteva nella perdita della maggior parte delle labbra vulvari e successiva chiusura della rima vulvare risultante in un orifizio pari a soli circa 2 mm. Il danno anatomico aveva conseguenze anche di tipo funzionale: la scrofa mostrava una alterazione del normale comportamento di minzione, con la comparsa di pollachiuria. Per ripristinare condizioni di benessere e consentire un parto naturale, la scrofa è stata sottoposta con successo ad un intervento chirurgico di ampliamento della rima vulvare.

Abstract. In a farrow to finish herd with 300 breeding sows, a granparent Large White sow had her vulva bitten by her piglets in the farrowing crate. The cannibalism induced anatomical changes consisting in a loss of most of the vulva's labias and a subsequent closure of the interlabial sulcus resulting in a reduction of the opening to about only 3 mm. The anatomical changes had functional consequences resulting in: an abnormal urinating behaviour, consisting in pollakiuria. In order to re-establish a welfare condition and to allow a natural farrowing, the animal underwent successfully a plastic surgery to enlarge the interlabial solcus.

INTRODUZIONE ED OBIETTIVI

La morsicatura della vulva è un problema di tipo comportamentale che si può manifestare nelle scrofe stabulate in gruppo (Kroneman A. et al., 1993; Gjein H. and Larssen, R.B. 1995). La morsicatura della vulva è un comportamento anomalo rappresentato, come dice il nome stesso, dalla morsicatura delle labbra vulvari di un animale da parte di un altro. L'esito di tale comportamento è rappresentato da semplici ferite a lacerazioni, ablazioni parziali o anche totali di una o entrambe le labbra della vulva.
L'instaurarsi di questo problema comportamentale è stato associato alla stabulazione di grup-

po, all'aumento della numerosità del gruppo, alla presenza di lettiera in paglia, ad un'unica somministrazione giornaliera di alimento, ad un elevato numero di animali per succhiotto presente (Bracke M., 2007).
In ogni caso, la presenza di lesioni vulvari rappresenta un importante indicatore di benessere sia per l'animale morsicato che prova dolore per l'aggressione, sia per l'animale morsicatore il cui comportamento può essere espressione di frustrazione (Bracke M., 2007). In particolare, sembra che questo comportamento si manifesti quando il fabbisogno primario di tipo alimentare non soddisfatto.
In condizioni particolari è stata osservata anche una morsicatura della vulva da parte dei suinetti in gabbia parto (Ladewig J., 1984). Tale atteggiamento dei suinetti avviene per cause non ben chiare, anche se è possibile che un ruolo determinante giochino le condizioni ambientali poco favorevoli e l'ipogalassia della scrofa.

MATERIALI E METODI

Allevamento
Il caso di *vulva biting* è stato osservato in un allevamento a ciclo chiuso di 300 scrofe che utilizzava una rimonta interna di scrofette e procedeva ad una produzione interna delle scrofette granparentali di razza Large White. Dopo 4 settimane di lattazione il *pig flow* aziendale prevedeva il trasferimento delle scrofette alle gabbie di gestazione singole per la fecondazione e le prime fasi di gestazione e successivamente ai box di gestazione di gruppo dove erano presenti 6 animali in box con pavimentazione piena delle dimensioni di 18 metri quadrati di superficie libera ed un parchetto esterno in grigliato delle dimensioni di 3 metri quadrati.

Caso clinico
La scrofa era stata colpita da morsicatura in gabbia parto, dove il cannibalismo dei propri suinetti aveva portato alla completa ablazione della vulva. All'insorgenza del calore, avvenuto regolarmente dopo cinque giorni dallo svezzamento, la scrofa presentava le lesioni di cannibalismo, ma la pervietà vulvare, ancora nella norma, aveva consentito una normale fecondazione.
A seguito dell'esame ecografico, che confermava l'avvenuta gravidanza, l'allevatore notava che le rime vulvari erano completamente cicatrizzate tra loro, condizione che non avrebbe potuto consentire il parto.
Da un punto di vista anatomico era presente una completa ablazione delle labbra vulvari ed il meato vulvare era ridotto a soli due millimetri circa: una piccola soluzione di continuo che permetteva all'animale di urinare (fig.1), anche se, da un punto di vista funzionale, il comportamento di orinazione della scrofa risultava completamente alterato: in sostituzione di circoscritte e copiose emissioni di urina tipiche della specie, la scrofa manifestava ridotte emissioni di urina ad intervalli di pochi minuti (pollachiuria), che obbligavano l'animale ad una prolungata stazione quadrupedale.

Intervento
L'animale è stato spostato in un locale idoneo dell'allevamento e sottoposto ad anestesia locale (lidocaina cloridrato). Dopo aver preparato il campo operatorio grazie ad una detersione ed una disinfezione (PVP Iodio), si è proceduto all'incisione del tessuto cicatriziale riportandolo alle originarie dimensioni. Tale azione, che ha immediatamente esteriorizzato vagina e cli-

Fig. 1: *Quadro pre-operatorio*

Fig. 2: *Quadro post-operatorio*

Fig. 3: *Quadro a 15 giorni dall'intervento*

toride, è stata seguita da una sutura a punti semplici con filo Dexon 2.0 con ago curvo non traumatico al fine di promuovere la cicatrizzazione tra mucosa e cute (fig.2). La ferita è stata costantemente monitorata da parte dell'allevatore che, per evitare una nuova anomala cicatrizzazione ha umettato regolarmente la breccia operatoria con un gel cicatrizzante ed emolliente a base di prodotti naturali.
All'animale è stata somministrata una terapia antibiotica a base di amoxicillina ad azione prolungata (*long acting*).
Al controllo post-operatorio effettuato dopo 15 giorni la ferita risultava rimarginata di prima intenzione ed il meato vulvare pervio, pertanto si è proceduto alla rimozione dei punti (fig.3).

RISULTATI

Pur non essendo più presenti le labbra vulvari, la vulva dell'animale ha riacquistato l'originale pervietà dell'orifizio. Questa correzione chirurgica ha consentito all'animale di riprendere una normale orinazione e di effettuare un parto naturale e normale. Dal momento che al parto non sono stati evidenziati problemi né di tipo fisiologico né di tipo anatomico, è stato deciso di far proguire all'animale la normale carriera riproduttiva.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il D.L. 146/2001 "Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti" prescrive che "gli animali malati o feriti devono ricevere immediatamente un trattamento appropriato e, qualora un animale non reagisca alle cure in questione, deve essere consultato un medico veterinario". Nel presente caso clinico un intervento del medico veterinario era necessario per assicurare un ripristino delle condizioni di benessere dell'animale ed evitare il ricorso ad un taglio cesareo. E' evidente che tutte le strategie manageriali più idonee devono essere di volta in volta messe in atto per evitare che la competizione per le risorse alimentari o per gli altri bisogni primari determini aggressioni tra gli animali. Se queste condizioni sono note per la stabulazione in gruppo delle scrofe gestanti è ancora poco chiaro, invece, quali siano i fattori scatenanti che portano i suinetti alla morsicatura della vulva in gabbia parto, anche per la scarsità delle segnalazioni di questo fenomeno. Nonostante questo evento sia raro, la sua manifestazione rappresenta senza dubbio un importante segnale sia dal punto di vista gestionale che di benessere animale. La sua insorgenza, infatti, così come l'insorgenza di fenomeni di *bell noising* in sala parto è indice di errori manageriali nella gestione dei suinetti che per carenze o stress non completamente chiariti manifestano comportamenti aberranti rispetto al proprio etogramma. La comparsa di questo tipo di cannibalismo evidenzia, inoltre, quali siano i limiti, da un punto di vista del benessere animale, del contenimento della scrofa in gabbia parto. Oltre alla possibile insorgenza di danni di tipo anatomico (ulcere da decubito) e alla limitata possibilità di movimento ed espressione del proprio repertorio comportamentale, l'animale può divenire anche, senza possibilità di protezione e fuga, oggetto di cannibalismo da parte delle propria nidiata.

Bibliografia

1. Bracke M. (2007) "Vulva biting" in: Velarde A. and. Geers R "On farm monitoring of pig welfare", 1a ed., Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, 65-69.
2. D.Lgs. 26-3-2001 n. 146, "Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti". Pubblicato nella G. U. 24 aprile 2001, n. 95.
3. Gjein H. and Larssen R.B. (1995) "Housinging pregnant sows in loose and confined systems – a field study.1. Vulva and body lesions, culling reasons and production results". Acta Vet Scand, 36, 185-200.
4. Ladewig J., Sppel P.K. and Kallweit E. (1984). "A case of reversed cannibalism: The piglets damaging the sow". Ann Rech Vet, 15, 275-277.
5. Kroneman A., Vellenga L., Van der Wilt F.J. and Veermer H.M. (1993) "Review of health problems in group-housed sows, with special emphasis on lameness". Vet Quart 15, 26-29.

Prodotti per la salute animale

CEVA VETEM S.p.A. - Via Colleoni 15 - 20041 Agrate Brianza (MI)
Tel. 0396559.442 - Fax 0396559.244
e-mail: marketing.italy@ceva.com **www.cevavetem.it**

CEVA
SANTE ANIMALE

CEVA VETEM

SOMMINISTRAZIONE DI PAGLIA MEDIANTE DISPENSER IN SUINI A CODA LUNGA E A CODA CORTA: VALUTAZIONE DEL CANNIBALISMO DELLA CODA E DELLE ORECCHIE.

STRAW ADMINISTRATION BYDISPENSER IN LONG AND TAIL DOCKED PIGS: EVALUATION OF TAIL AND EAR BITING

CANDOTTI P. [1], GUIZZARDI F. [2], ROTA NODARI S. [1], GUERZONI S. [3] , TURCI S. [3]

[1]*Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale, Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia;*
[2]*ASL, Mantova*
[3]*Libero professionista, Mantova*

Parole chiave: morsicatura della coda, morsicatura delle orecchie, paglia, suino, benessere

Key words: tail biting, ear biting, straw, pig, welfare

Riassunto. In un sito due di suini commerciali è stata valutata l'influenza della paglia sull'insorgenza delle lesioni da morsicatura delle orecchie e della coda. Trecentotrentasei suini a cui era stata asportata la coda a due giorni di vita e 314 suini a cui la coda era stata lasciata integra sono stati suddivisi in 4 sottogruppi: gruppo A con somministrazione di paglia (coda lunga), gruppo B senza somministrazione di paglia (coda lunga), gruppo C con somministrazione di paglia (coda corta), gruppo D senza somministrazione di paglia (coda corta). La paglia è stata somministrata dal giorno T0 (giorno di svezzamento: 28 giorni di vita) al giorno T47, mentre da T48 a T71 ai suini non è stata somministrata paglia. Le lesioni da morsicatura sono state osservate a T47 e T71. La somministrazione di paglia è stata in grado di ridurre l'insorgenza della morsicatura nel gruppo A rispetto al gruppo B ($p<0.05$) finché è stata somministrata. Dopo la rimozione della paglia la prevalenza di suini con lesioni di morsicatura alla coda a T71 non differiva significativamente tra il gruppo A e il B. Nei gruppi C e D non vi erano differenze significative nella prevalenza delle lesioni a T47, mentre a T71 era maggiore la prevalenza dei suini con lesioni nel gruppo D rispetto al gruppo C ($p<0.05$). Nei suini del gruppo D le lesioni all'apice delle orecchie erano significativamente più elevate rispetto ai gruppi B e C sia a T47 che a T71 ($p<0.05$).

Abstract. The influence of straw on tail and ear biting in pigs was evaluated in a site 2 commercial farm. 336 pigs tail docked at 2 days of age and 314 pigs not tail-docked were divided in 4 groups: group A (straw administered, long tail); group B (no straw, long tail); group C (straw administered, tail docked); group D (no straw, long tail). Straw was given between D0 (day of weaning: 28 days of life) and D47 but not between D48 and D71. Ear and tail lesions were recorded at day 47

and 71. Straw significantly reduced tail lesions in group A compared to group B ($p<0.05$) while it was administered. After the removal of the straw, the prevalence of tail lesions at T71 did not differ between group A and B. Groups C and D did not differ significantly at T47, while at T71 the prevalence of pigs with tail lesions was higher in group D compared to group C ($p<0.05$). Lesions at the apex of the ear were significantly higher in group D compared to group B and C both at D47 and D71 ($p<0.05$).

INTRODUZIONE

Il D.Lgs. 30-12-1992 n. 534, "Attuazione della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini", pubblicato nella G.U. 11 gennaio 1993, n. 7, S.O. e succ. modifiche prescrive che "i suini devono avere accesso permanente a una quantità sufficiente di materiali che consentano loro adeguate attività di esplorazione e manipolazione, quali ad esempio paglia, fieno, legno, segatura, composti di funghi, torba o un miscuglio di questi, salvo che il loro uso possa comprometterne la salute o il benessere". Tale prescrizione normativa deriva dalla necessità di assicurare ai suini la possibilità di esprimere, almeno parzialmente, anche in condizioni di allevamento, parte del proprio repertorio comportamentale. All'interno dell'etogramma del suino una delle modalità comportamentali che per il suino rappresenta un bisogno primario è proprio l'attività di grufolamento e ricerca del cibo, che gli animali, in condizioni di libertà, svolgono per la maggior parte del giorno. L'esplorazione rappresenta un importante comportamento per assumere informazioni relative all'ambiente circostante e alle risorse disponibili (Wemelsfelderand Birke, 1997). Anche con acqua, cibo e ricovero a disposizione i suini allevati hanno comunque la necessità di attuare il comportamento di tipo esplorativo (Scott et al., 2007).
Diversi studi (Beattie et al., 2000; Petersen et al., 1995) hanno evidenziato che i suini di tutte le età utilizzano materiale manipolabile quando questo viene messo a disposizione. Una revisione sistematica condotta nel 2004 da Rota Nodari e Candotti ha evidenziato come la paglia abbia un probabile effetto positivo nel ridurre l'insorgenza del *tail biting*, ma che, tuttavia, il numero esiguo di studi a disposizione non ha consentito di effettuare un'elaborazione di tipo statistico per una corretta metanalisi.

MATERIALI E METODI

La prova si è svolta in un sito 2 (svezzamento) di un allevamento del Nord Italia.
Per la prova sono stati selezionati 650 suini ibridi a tre vie (padre Duroc Italiano, madre scrofa ibrida Large White x Landrace 25%) di 28 giorni di vita (giorno dello svezzamento) provenienti da un'unica scrofaia.
A due giorni di vita a 336 dei suinetti era stata asportata la coda in prossimità della terza vertebra caudale con termocauterio mentre ai restanti 314 era stata lasciata integra.
Il giorno di inclusione nella prova gli animali con coda lunga pesavano mediamente

Fig. 1: *il dispenser di paglia utilizzato nella sperimentazione*

7,2 chili mentre quelli a coda corta pesavano 7,7 chili. Al momento dell'inclusione i suini non presentavano alcuna lesione da morsicatura né alla coda né alle orecchie. Il gruppo sperimentale è stato suddiviso in 4 sottogruppi:

- gruppo A (174 animali): coda lunga con paglia, disposti in 6 box
- gruppo B (140 animali): coda lunga senza paglia, disposti in 5 box
- gruppo C (183 animali): coda corta con paglia, disposti in 6 box
- gruppo D (153 animali): coda corta senza paglia, disposti in 5 box.

I box erano mediamente popolati da circa 30 animali (29+/-1).
I box erano caratterizzati da una stanza interna (314cmx230cm) ed un parchetto esterno, entrambi in pavimentazione piena, di analoga dimensione; il parchetto esterno era caratterizzato da un sistema di drenaggio delle deiezioni sovrastato da un grigliato in materiale plastico (larghezza 50cm) che correva lungo tutti i parchetti.
In ogni stanza interna erano allocate 2 mangiatoie lineari lunghe 80 cm per la somministrazione di mangime "a volontà" ed un abbeveratoio "a tazzetta".
Nei gruppi A e C la paglia veniva somministrata mediante balle di paglia delle dimensioni di 95x40x55cm avvolte da una rete in maglia d'acciaio per recinzioni con

fori di dimensioni 10x5cm (Fig.1). Le balle, avvolte su tutta la superficie, erano appese al soffitto della stanza interna, con un semplice sistema di catenelle e gancetti, per poterne adeguare l'altezza alla crescita dei suini in modo tale da mantenerle sempre ad una altezza di 4-5 cm al di sopra del garrese degli animali. La paglia è stata somministrata in modo continuo dall'inizio della prova (T0) per 47 giorni (T47).
Durante la sperimentazione gli animali sofferenti sono stati prontamente allontanati dal gruppo e soccorsi secondo le indicazioni del Veterinario curante. Tali suini sono usciti dalla prova.
Durante la prova, della durata di 71 giorni (T0-T71), sono state eseguite punteggiature individuali delle lesioni alla coda ed all'orecchio (T47 e T71) e sono stati registrati i dati zootecnici (T0 e T71).
Per la punteggiatura delle lesioni alle orecchie e alla coda è stato applicato il seguente schema:

Orecchie, apice:

grado 0: nessuna lesione
grado 1: graffi senza perdita di tessuto
grado 2: graffi con sangue senza perdita di tessuto
grado 3: perdita di tessuto fino a metà del padiglione (da 1/3 a 3/3)

Orecchie, base:

grado 0: nessuna lesione
grado 1: graffi senza perdita di tessuto
grado 2: graffi con sangue senza perdita di tessuto
grado 3: perdita di tessuto fino a metà del padiglione (da 1/3 a 3/3)

Coda:

grado 0: nessuna lesione
grado 1: graffi senza perdita di tessuto
grado 2: graffi con sangue senza perdita di tessuto
grado 3: perdita di tessuto (da 1/3 a 3/3 della lunghezza)

Analisi statistica

Sulla prevalenza delle lesioni alla coda a T47 e T71 è stato applicato un test non parametrico del chi *quadrato* con un grado di libertà. Il confronto è stato effettuato rispettivamente tra i sottogruppi A e B e tra i sottogruppi C e D.

RISULTATI

Tabella 1: punteggiatura apice delle orecchie a T47

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga con paglia	174	172	2	0	0	0	0
Gruppo B Coda lunga senza paglia	140	134	3	3	0	0	0
Gruppo C Coda corta con paglia	183	182	1	0	0	0	0
Gruppo D Coda corta senza paglia	153	123	21	9	0	0	0

Tabella 2: punteggiatura base delle orecchie a T47

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga con paglia	174	167	6	0	1	0	0
Gruppo B Coda lunga senza paglia	140	129	4	4	3	0	0
Gruppo C Coda corta con paglia	183	179	4	0	0	0	0
Gruppo D Coda corta senza paglia	153	148	3	0	1	0	0

Tabella 3: punteggiatura coda a T47

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga con paglia	174	155	3	16	0	0	0
Gruppo B Coda lunga senza paglia	140	72	1	42	23	2	0
Gruppo C Coda corta con paglia	183	0	0	0	0	0	0
Gruppo D Coda corta senza paglia	153	149	3	0	1	0	0

Tabella 4: punteggiatura apice delle orecchie a T71

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga dopo asportazione della paglia	157	157	0	0	0	0	0
Gruppo B Coda lunga senza paglia	129	125	2	0	2	0	0
Gruppo C Coda corta dopo asportazione della paglia	183	181	2	0	0	0	0
Gruppo D Coda corta senza paglia	150	136	0	3	9	2	0

Tabella 5: punteggiatura base delle orecchie a T71

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga dopo asportazione della paglia	157	157	0	0	0	0	0
Gruppo B Coda lunga senza paglia	129	122	1	0	6	0	0
Gruppo C Coda corta dopo asportazione della paglia	183	168	10	4	0	0	1
Gruppo D Coda corta senza paglia	150	120	22	4	3	1	0

Tabella 6: punteggiatura code a T71

	Numero suini	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3 (1/3)	Grado 3 (2/3)	Grado 3 (3/3)
Gruppo A Coda lunga dopo asportazione della paglia	157	54	0	34	47	17	5
Gruppo B Coda lunga senza paglia	129	29	7	15	56	15	7
Gruppo C Coda corta dopo asportazione della paglia	183	181	2	0	0	0	0
Gruppo D Coda corta senza paglia	150	138	2	2	0	2	6

Tabella 7: dati cumulativi delle lesioni alle orecchie

	N°	N°suini con lesioni alla base delle orecchie	N°suini senza lesioni alla base delle orecchie	N°suini con lesioni all'apice delle orecchie	N°suini senza lesioni all'apice delle orecchie	N°	N°suini con lesioni alla base delle orecchie	N°suini senza lesioni alla base delle orecchie	N°suini con lesioni all'apice delle orecchie	N°suini senza lesioni all'apice delle orecchie
	T47						T71			
Gruppo A Coda lunga con paglia	174	7	167	2	172	157	0	157	0	157
Gruppo B Coda lunga senza paglia	140	11	129	6	134	129	7	122	4	129
Gruppo C Coda corta con paglia	183	4	179	1	182	183	15	168	2	181
Gruppo D Coda corta senza paglia	153	4	149	30	123	150	30	120	14	136

Legenda: N°= numero di animali presenti nel gruppo

La prevalenza delle lesioni all'apice dell'orecchio sia a T47 era significativamente maggiore nel gruppo D rispetto al gruppo C e B ($p<0.05$). La prevalenza delle lesioni all'apice dell'orecchio a T71 era significativamente maggiore nel gruppo D rispetto al gruppo C ($p<0.05$) e B ($p<0.05$). La prevalenza delle lesioni alla base dell'orecchio era significativamente maggiore nel gruppo D rispetto al gruppo C e B a T71 (<0.05).

Tabella 8: confronto tra gruppi della prevalenza di lesioni (dati cumulativi)

	Numero suini	Numero di suini senza lesioni (né alla coda né alle orecchie)	Numero di suini senza lesioni alla coda	Numero di suini con lesioni alla coda	Numero di suini osservati	Numero di suini senza lesioni (né alla coda né alle orecchie)	Numero di suini senza lesioni alla coda	Numero di suini con lesioni alla coda
	T47				T71			
Gruppo A Coda lunga con paglia	174	145 (83%)	155 (89%)	19 (11%)	157	54 (34%)	54 (34%)	103 (66%)
Gruppo B Coda lunga senza paglia	140	62 (44%)	72 (51%)	68 (49%)	129	27 (21%)	29 (22%)	100 (77,5%)
Gruppo C Coda corta con paglia	183	178 (97%)	183 (100%)	0 (0%)	183	165 (90%)	181 (99%)	2 (1%)
Gruppo D Coda corta senza paglia	153	124 (81%)	149 (97%)	4 (2,6%)	150	108 (72%)	108 (72%)	12 (8%)

La prevalenza di lesioni alla coda a T47 era significativamente diversa ($p<0.05$) tra il gruppo A e il gruppo B e tra il gruppo B e il gruppo D, mentre non lo era tra il gruppo C e D ($p<0.05$).
La prevalenza di lesioni alla coda a T71 non era significativamente diversa ($p<0.05$) tra il gruppo A e il gruppo B mentre lo era tra il gruppo B e il gruppo D ($p<0.05$) e tra il gruppo Cw e D ($p<0.05$).

Tabella 9: risultati ponderali dei gruppi

T0	T47 (età 74 giorni)				T71 (età 99 giorni)			
Peso medio	Gruppo		N°	Peso Medio (IPMG T0-T47)	Gruppo		N°	Peso Medio (IPMG T47-71)
7,2 kg	Coda lunga	con paglia	174	24.25 kg (363 g)	Coda lunga	Senza paglia	172	37.91 kg (569 g)
		Senza paglia	140	21.05 kg (295 g)			123	35.45 kg (600 g)
	Coda corta	con paglia	183	24.09 kg (359 g)	Coda corta		178	39.32 kg (635 g)
		Senza paglia	153	21.87 kg (312 g)			145	37.79 kg (663 g)

Legenda: N°= numero di animali presenti nel gruppo

DISCUSSIONE

I risultati hanno evidenziato che, nelle condizioni dell'esperimento, l'allevamento di animali a coda lunga senza un arricchimento ambientale caratterizzato anche dalla possibilità di ingestione quale la paglia, non è possibile senza incorrere in gravi lesioni della coda (49% di animali lesionati dopo 47 giorni). Al contrario, la somministrazione di paglia, oltre a contenere brillantemente le lesioni alla coda lunga, ha determinato anche un notevole miglioramento degli incrementi ponderali sia negli animali a coda lunga che in quelli a coda corta. Nonostante, al termine della sperimentazione, il miglioramento del peso sia ancora ben evidente, il risultato appare meno eclatante di quanto potesse essere prevedibile dopo i primi 47 giorni di osservazione, forse a causa dell'allontanamento della paglia.
Di sicuro interesse sono anche i risultati ottenuti dopo l'allontanamento della paglia:
a) il gruppo A con coda lunga ha manifestato gravi disturbi comportamentali con aggressioni alle code
b) il gruppo C a coda corta non ha subito modificazioni comportamentali.
Questi dati confermano, come noto, che l'allontanamento del materiale esplorabile può essere mal sopportato dagli animali (Day J.E.L. et al., 2002) e che il taglio della coda, ottimo metodo per impedire il cannibalismo, può non perdere di efficacia in assenza di paglia, anche se nel gruppo D all'aumentare dell'età è stato osservato un aumento della prevalenza (dal 2.6% all'8% degli animali colpiti).
Come evincibile dalle tabelle è interessante come il cannibalismo delle orecchie abbia colpito maggiormente i suini a coda corta senza paglia rispetto agli altri gruppi. Questo riscontro potrebbe far ipotizzare che in assenza di una coda lunga sui compagni, i suini si siano diretti verso l'estremità delle orecchie.
In tutta la sperimentazione, la paglia non ha influenzato negativamente il drenaggio delle deiezioni.

CONCLUSIONI

L'utilizzo degli arricchimenti ambientali è una imposizione tra le più difficili da comprendere dal mondo degli allevatori, che tradizionalmente hanno sempre allevato senza queste "attenzioni", in moltissimi casi ottenendo risultati zootecnici eccellenti.
E' evidente che l'imposizione della somministrazione di materiale manipolabile agli animali deve tener conto della reale fattività nei diversi sistemi aziendali. Tuttavia, spesso, la somministrazione di arricchimento ambientale rappresenta più uno scoglio di tipo psicologico che una reale impossibilità tecnica e, nel rispetto della legge e delle esigenze primarie degli animali, ogni sforzo dovrebbe essere intrapreso per ottenere soluzioni tecniche accettabili.
Concludendo, i risultati della sperimentazione hanno confermato il ruolo importante della paglia quale materiale manipolabile, esplorativo nel contenimento dei comportamenti eterodiretti indesiderati. Inoltre, la somministrazione della paglia attraverso dispensatori, pur rudimentali, ha consentito il rispetto della legge anche per quanto riguarda la caudotomia, pratica oggi non più consentita come intervento di prassi.

Bibliografia

1. Beattie V.E., Walzer N., Sneddon I.A. (1995) "Effects of environmental enrichment on the behaviour, performance and meat quality of domestic pigs". Livest. Prod. Sci., 65, 71-79.
2. Day J.E.L., Burfoot A., Docking C.M., Whittaker X., Spoolder H.A.M., Edwards S.A. (2002) "The effects of prior experience of straw and the level of straw provision on the behaviour of growing pigs". Appl. Anim. Behav. Sci., 76, 189-202.
3. D.Lgs. 30-12-1992 n. 534, "Attuazione della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini", pubblicato nella Gazz. Uff. 11 gennaio 1993, n. 7, S.O.
4. Peterson 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.
5. Rota Nodari S., Candotti P. (2004) "Influenza della paglia e del sesso sull'insorgenza del tail biting: una revisione sistematica". In "Atti della società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini", XXX Meeting annuale, Salsomaggiore Terme (PR), 25-26/3/2004, 289-303.
6. Scott K., Taylor L., Bhupinder P.J., Edwards S.A. (2007) "Influence of different types of environmental enrichment on the behaviour of finishing pigs in two different housing systems 2. Ratio of pig to enrichment". Appl. Anim. Behav. Sci, 105, 51-58.
7. Wemesfelder F., Birke L. (1997) "Environmental challenge", in: Appleby M.C., Huges B.O. (Eds), "Animal Welfare", CAM International, 35-47.

EFFICACIA DI UNA PREMISCELA PER ALIMENTI MEDICAMENTOSI, A BASE DI FLORFENICOLO (NUFLOR®) IN COMPARAZIONE A UNA PREMISCELA DI CONTROLLO, NEL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA RESPIRATORIA SUINA

EFFICACY OF A FLORFENICOL (NUFLOR®) FEED PREMIX IN THE TREATMENT OF SWINE RESPIRATORY DISEASE (SRD), COMPARED TO AN ANALOGOUS PRODUCT

ALBERTO ERMANNO CEVIDALLI[1], ERNESTO BONGIOVANNI[2], MARCO BOSETTI, [3]

[1]***: Intervet Schering-Plough Animal Health, Segrate (MI)***
[2]***: Medico Veterinario, Casalbellotto (CR)***
[3]***: Medico Veterinario, Soncino (CR)***

Parole chiave: malattia respiratoria suina, premiscela, florfenicolo

Key words: Swine Respiratory Disease, SRD, premix, florfenicol

Riassunto. Allo scopo di valutare l'efficacia del florfenicolo, somministrato mediante il mangime alla dose di 10 mg/kg p.v. per 5 giorni consecutivi, nel trattamento della malattia respiratoria suina, è stato portato a termine uno studio comparativo di campo. Lo studio si è svolto nelle sezioni di magronaggio di due allevamenti a ciclo chiuso. Quando almeno il 10% dei suini di un box mostrava sintomi respiratori acuti, il box veniva incluso nello studio e allocato a random a uno dei seguenti trattamenti: mangime medicato con 500 g/quintale di Nuflor premix (Intervet Schering-Plough), equivalente a 200 ppm di florfenicolo, oppure 1,4 kg/quintale di un prodotto premix in commercio, contenente un'associazione di due antibiotici, equivalente a 1400 ppm di sulfadimetossina e 560 ppm di clortetraciclina (CTC). Ciascun box è stato incluso nello studio, indipendentemente dagli altri, una volta che si verificavano le condizioni previste, e il periodo di trattamento durava 5 giorni (giorni 0-4). L'unità sperimentale era rappresentata dal box ed entrambe le popolazioni (malata ed esposta) erano mescolate in ciascun box. I parametri di valutazione dell'efficacia sono stati quelli tipici per la malattia respiratoria suina e comprendevano: temperatura rettale, dispnea, depressione e *Clinical Illness Index* Score (CIIS). Gli animali sono stati sottoposti a osservazione clinica per 12 giorni (giorni 0-11). Il successo terapeutico (popolazione "malata") o preventivo (popolazione "esposta") hanno rappresentato le variabili primarie per la valutazione dell'efficacia dei due trattamenti, al giorno 6 e al giorno 11. Settecentotrenta (730) suini sono stati inclusi nello studio al giorno 0, di cui 117 mostravano segni acuti di malattia respiratoria e 616 appartenevano invece alla popolazione esposta ma non clinicamente malata. In totale, 422 suini sono stati trattati con florfenicolo, mediante la somministrazione di mangime medicato, e 311 con il prodotto di controllo. Con l'eccezione del successo preventivo (animali esposti) al giorno 6, in tutti gli altri casi le percentuali di successo sono state a favore del gruppo medicato con florfenicolo, raggiungendo la significatività statistica per la percentuale di successo nella popolazione esposta al giorno

11. Relativamente all'andamento dei singoli parametric clinici (temperatura rettale, dispnea, depressione, punteggio CIIS) il florfenicolo ha mostrato in generale una maggiore efficacia, avvalorata dalle sporadiche significatività statistiche costantemente in favore del florfenicolo.

Abstract. A comparative field trial has been carried out with the objective to evaluate the efficacy of florfenicol administered in feed at a dose of 10 mg/kg body weight for five consecutive days in the treatment of SRD under Italian field conditions. Growers' units of two Farrow-to-finish herds were used as experimental sites. When at least 10% of the pigs in a pen exhibited acute respiratory signs, the pen was included in the trial and randomly allocated to one of the following treatment: 500 g of Nuflor premix (Intervet Schering-Plough) mixed in 100 kg of feed, equivalent to 200 ppm of florfenicol, or 1.4 kg of a commercial premix containing a combination of 2 different antibiotics in 100 kg of feed, equivalent to 1400 ppm of Sulfadimethoxine and 560 ppm of CTC. Pens have been included independently of each other once the inclusion criteria were met, and the treatment period was 5 days (days 0-4). The experimental unit was the pen and both populations (clinically ill and exposed) were commingled in each pen. The efficacy parameters were typical for swine respiratory disease and included: rectal temperature, dyspnoea, depression and Clinical Illness Index Score (CIIS). The animals were observed for 12 days (Day 0 to Day 11). Success rates, therapeutic success for the "ill" population and success in the prevention of illness for the "exposed" population, have been established on Day 6 and on Day 11. Seven hundred thirty three pigs were included in the trial on Day 0: 117 showed acute respiratory signs and 616 belonged to the exposed population. Altogether, 422 pigs were treated with florfenicol-medicated feed and 311 with control product. With the exception of prevention success (exposed animals) at Day 6, differences in success rates were always in favour of the florfenicol-medicated animals and reached statistical significance for the % of success in the exposed population at Day 11. Regarding the single parameters (rectal temperature, dyspnoea, depression, CIIS), florfenicol showed in general a better efficacy, with sporadic statistical significance always in favour of florfenicol.

INTRODUZIONE

Il florfenicolo è un antibiotico di sintesi ad ampio spettro appartenente al gruppo dei fenicoli. Precedenti studi hanno evidenziato la sua elevata efficacia nei confronti delle infezioni respiratorie del suino quando somministrato per via intramuscolare, anche in condizioni di campo italiane (1,2). L'obiettivo di questo studio clinico era confermare i risultati positivi ottenuti in precedenza con la somministrazione parenterale, impiegando una nuova formulazione orale (Nuflor Premix) e valutandone sia l'efficacia terapeutica che preventiva nei confronti della Malattia Respiratoria Suina, in comparazione a un altro prodotto analogo in commercio.

MATERIALI E METODI

Allevamenti

Reparti di magronaggio di due allevamenti suini a ciclo chiuso della Lombardia, con anamnesi storica di malattia respiratoria, ed isolamento a livello polmonare di A. *pleuropneumoniae*, *P. multocida* e *S.suis*

Animali
Suini da ingrasso, ibridi commerciali, da 23 a 49 kg p.c. (ad inizio prova).

Trattamento
Gruppo test: mangime sfarinato secco medicato con 500 g/q.le di Nuflor Premix (Intervet Schering-Plough Animal Health), pari a 200 ppm di florfenicolo, somministrato per 5 giorni consecutivi (giorni della prova: 0-4)
Gruppo di controllo: mangime sfarinato secco medicato con 1,4 kg/q.le di un prodotto commerciale contenente un'associazione di 2 antibiotici, pari a 1.400 ppm di sulfadimetossina e 560 ppm di clortetraciclina, per 5 giorni consecutivi (giorni della prova: 0-4)

Disegno sperimentale:
Allo scopo di valutare lo stato di malattia dei suini, lo sperimentatore attribuiva un punteggio clinico complessivo e dei punteggi specifici relativi allo stato di depressione del sensorio e alla dispnea. Ai suini che presentavano segni clinici di malattia respiratoria veniva inoltre misurata la temperatura rettale.

Criteri di inclusione:

Suini:
Venivano considerati colpiti da infezione respiratoria acuta, e quindi "malati", i suini con:
Punteggio clinico complessivo ≥ 1 (scala 0-4)
+ depressione del sensorio ≥ 2 (scala 0-3)
+ dispnea ≥ 2 (scala 0-3)
+ emperatura rettale ≥ 40,3°C

Box:
Quando almeno il 10% dei suini di un box mostrava segni acuti di Malattia Respiratoria, il box veniva allocato, a random, a uno dei due gruppi di trattamento, e tutti i suini in esso presenti venivano alimentati con mangime medicato con uno dei due prodotti in studio. Il trattamento effettuato agli animali malati è stato definito TERAPEUTICO, mentre quello effettuato ai restanti animali del box, esposti alla malattia, è stato definito PREVENTIVO.

Criteri di esclusione e trattamenti concomitanti:
I suini che prima dell'inizio della prova risultavano affetti da malattia respiratoria in forma cronica o manifestavano segni di malattia sistemica diversa da quella respiratoria, sono stati esclusi dallo studio. Durante i 5 giorni di medicazione e nei 7 giorni precedenti, non era ammesso l'impiego orale o parenterale di altri antibiotici o di farmaci antinfiammatori steroidei o non steroidei. Terminato il periodo di medicazione, in caso di necessità i suini potevano essere trattati per via iniettabile. Se il trattamento si rendeva necessario a causa della comparsa o della persistenza della sintomatologia respiratoria, questi suini venivano considerati come "insuccesso".

Procedura in cieco:
I silos contenenti i due mangimi medicati, e i box inclusi nello studio, sono stati contrassegnati con due diversi codici, in base al trattamento (Nuflor o prodotto di controllo). Nel sito B, sia la persona che somministrava i mangimi medicati, sia lo sperimentatore,

che valutava clinicamente i suini in prova, non erano a conoscenza dei codici identificativi dei due trattamenti (doppio cieco); mentre nel sito A solo lo sperimentatore (e la sua assistente) non erano a conoscenza, mentre la persona che somministrava il mangime era a conoscenza (cieco).

Valutazione dell'efficacia del trattamento

Tutti i suini in prova sono stati valutati giornalmente, dal primo giorno di medicazione del mangime (giorno 0) fino a 7 giorni dopo il termine del periodo di medicazione (giorno 11). La determinazione del rapporto successo/insuccesso è stata effettuata al giorno 6 (almeno 24 ore dopo l'ultima assunzione di mangime medicato) e al giorno 11.

-Attribuzione di insuccesso terapeutico (suini malati all'inizio dello studio) o insuccesso preventivo (suini clinicamente sani all'inizio della prova, ma conviventi con suini malati)

- morte per malattia respiratoria, dopo 5 giorni di medicazione
- grave malattia respiratoria, dopo 5 giorni di medicazione
- trattamento antibiotico iniettabile per malattia respiratoria, che si è reso necessario malgrado i 5 giorni di medicazione
- punteggio clinico complessivo ≥ 1 associato a T ≥ 40° C oppure a punteggio depressione ≥ 2 oppure a punteggio dispnea ≥ 2.

- Attribuzione di successo (terapeutico o preventivo):

- punteggio clinico complessivo = 0

oppure

- T < 40° C associato a punteggio depressione ≤ 1 associato a punteggio dispnea ≤ 1.

Valutazione degli incrementi ponderali

Al momento dell'inclusione di un box nello studio, è stata effettuata una pesata di gruppo dei suini in esso presenti, che è stata ripetuta al giorno 11. Eventuali suini morti o rimossi dallo studio (es. per grave malattia respiratoria che non ha risposto al trattamento orale o malattia concomitante) sono stati pesati individualmente al momento della rimozione.

Somministrazione dell'alimento e valutazione dei consumi

La somministrazione dei mangimi medicati (test e controllo) è stata effettuata manualmente per 5 giorni (giorni 0 – 4), avendo cura di alimentare gli animali ad *libitum* e contemporaneamente evitando gli sprechi. Pertanto è stato possibile determinare il consumo dei due gruppi in prova durante il periodo di medicazione, mentre non è stato possibile ottenere questo dato per i giorni 6-11.

ANALISI STATISTICA

Per l'intero campione i dati sono stati opportunamente sintetizzati mediante statistiche descrittive.

In particolare, frequenze assolute e percentuali sono state utilizzate nel caso di variabili qualitative, mentre media, deviazione standard (DS), valore minimo e valore massimo (range) e mediana costituiscono gli indici di sintesi per le variabili quantitative.

L'end-point primario (pivotal variable) per la popolazione clinicamente malata è la variabile binomiale: % di successo terapeutico determinata sia al giorno 6 sia al giorno 11.

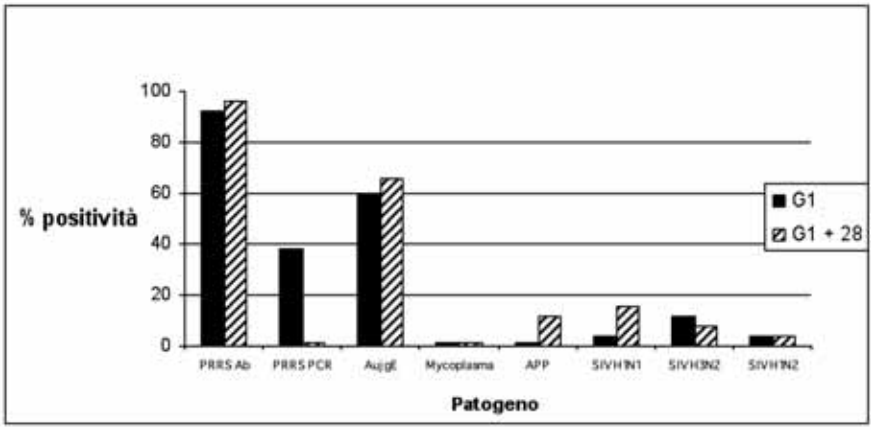
Per quanto riguarda la popolazione esposta, l'end-point primario (pivotal variable) è la variabile binomiale: % di successo preventivo. Per queste variabili l'analisi è stata effettuata in accordo al protocollo mediante regressione logistica nell'ambito di un modello mixed di analisi della varianza (SAS %GLIMMIX macro). Per ogni analisi primaria, l'intervallo di confidenza al 95% e a 2-code è stato ottenuto per la differenza delle % di successo terapeutico o per la differenza delle % di successo preventivo fra gruppo test e gruppo di controllo. Se il limite di confidenza inferiore della differenza "test vs. controllo" risulta maggiore o uguale a -10%, la non inferiorità sarà dimostrata.
Le variabili continue (temperature rettale e incremento ponderale) sono state analizzate con il test t di Student. I risultati sono riportati come differenze medie con i limiti di confidenza al 95% e valori di probabilità per un test a 2-code.
Le variabili espresse su scala ordinale (depressione, dispnea e punteggio complessivo di malattia) sono state analizzate utilizzando il test Chi-Quadrato. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite tramite le procedure SAS versione 9.1.3.

RISULTATI

Eziologia degli episodi respiratori
E' stato eseguito l'isolamento batteriologico da polmoni di animali deceduti nel corso della prova o nel periodo immediatamente precedente, di *A. pleuropneumoniae* biotipo 1 nel sito B e di streptococchi nel sito A, inoltre, sempre a livello polmonare, è stato evidenziata la presenza (tramite PCR) di PRRSv ceppo europeo (sito A).

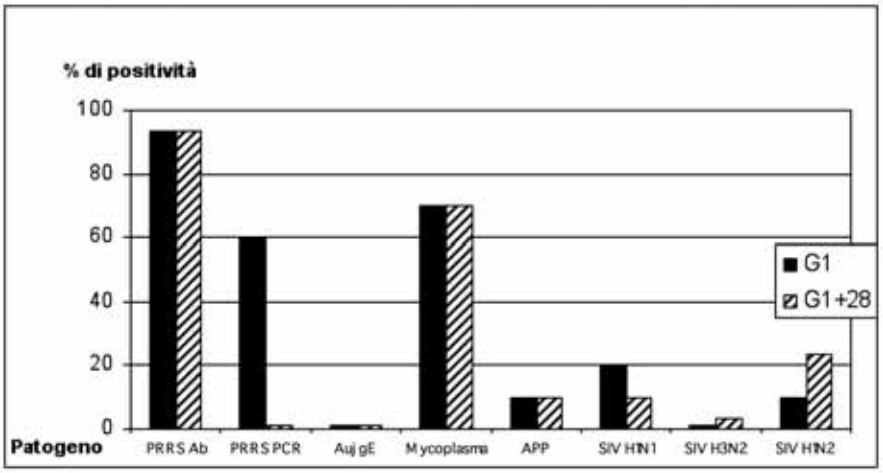
In ciascuno dei due siti sperimentali è stato eseguito un doppio prelievo di sangue da 30 suini del settore dove si è svolto lo studio, al giorno 1 (del primo box incluso nello studio) e dopo 4 settimane.

Grafico 1. Evoluzione delle positività sierologiche e della PCR per PRRS nel sito A
Graphic 1. Antibodies and PRRS PCR evolution - site A



Nota: i suinetti del sito A erano stati vaccinati 2 volte verso APP prima dell'inizio della prova.

Grafico 2. Evoluzione delle positività sierologiche e della PCR per PRRS nel sito B
Graphic 2. Antibodies and PRRS PCR evolution - site B



Nota: i suinetti del sito B erano stati vaccinati 2 volte verso M. hyopneumoniae e 2 volte verso APP prima dell'inizio della prova.

Animali inclusi nello studio
In totale sono stati inclusi nello studio 733 suini, ripartiti tra i due siti sperimentali, i due trattamenti e tra "malati" ed "esposti" (clinicamente sani ma stabulati nei box in cui erano presenti i suini malati), come indicato nella tabella 1.

Tabella 1. Popolazione in studio.
Table 1. Stratification of included animals.

Sito *Site*	**Trattamento** *Treatment*	**Tot suini** *Tot pigs*	**Malati** *Clinical*	**Esposti** *Exposed*
A	Florfenicolo premix	217	27	190
	Controllo	168	29	139
B	Florfenicolo premix	205	32	173
	Controllo	143	29	114

Per quanto riguarda le condizioni cliniche di partenza degli animali considerati malati, queste non differivano tra i due gruppi di trattamento.

Tabella 2. Distribuzione al Basale (giorno 0) della popolazione malata.
Table 2. Basal distribution (day 0) of the clinical population.

Variabile	Gruppo florfenicolo	Gruppo controllo	Tutti i malati	Valore p
Temperatura				
Media ± SD (N)	40.67±0.38	40.78±0.5	40.73±0.44	0.2027
Mediana (Min - Max)	40.58 (40.28 - 41.58)	40.56 (40.13 - 41.82)	40.57 (40.13 - 41.82)	
Punteggio complessivo di malattia				
1.lievemente malato	16.9	15.5	16.2	0.0680
2.moderatamente malato	78	65.5	71.8	
3.gravemente malato	5.1	19	12	
Depressione				
2.moderata	100	100	100	N
Dispnea				
2.moderata	96.6	96.6	96.6	0.9861
3.grave	3.4	3.4	3.4	

Mortalità e rimozioni post-inclusione

Le tabelle 3.1 e 3.2 riportano gli animali esclusi dallo studio in quanto deceduti (1 suino) o moribondi per malattia respiratoria (4 suini), prima di avere terminato il periodo di medicazione. Nel sito A sono anche stati eseguiti sui suini più gravi dei trattamenti antibiotici iniettabili durante il periodo di medicazione, malgrado non fossero consentiti dal protocollo sperimentale, per cui tali animali sono stati ovviamente esclusi dalla successiva valutazione di efficacia dei trattamenti orali. La ripartizione tra i due gruppi di trattamento dei trattamenti antibiotici iniettabili sopra riportati non differiva significativamente (vedi tabelle 3.1 e 3.2). I suini che invece hanno richiesto un trattamento antibiotico iniettabile, malgrado il completamento del periodo di medicazione, sono invece stati considerati degli insuccessi, come indicato nel paragrafo "materiali e metodi". Terminato il periodo di medicazione, in nessuno dei due siti sperimentali e per nessuno dei due gruppi di trattamento, è stata riportata alcuna mortalità.

Tabella 3.1 Morti/moribondi per malattia respiratoria e trattati per mal. respiratoria in G1 – G5. Ripartizione per sito.
Table 3.1 Dead/pneumonic muribund pigs and antibiotic injectable treatments during Days 1-5. Distribution by experimental site.

	Sito A	Sito B
Morti per mal. respiratoria	1 (in G 3)	0
Moribondi per mal. respiratoria		2 (in G 3)
Moribondi per mal. resp. + malattia concomitante		2 (G 2 e G 3)
Trattamenti iniettabili per mal. resp.	11	

Tabella 3.2 Morti/moribondi per malattia respiratoria e trattati per mal. respiratoria in G1 – G5. Ripartizione per gruppo di trattamento.
Table 3.2 Dead/pneumonic muribund pigs and antibiotic injectable treatments during Days 1-5. Distribution by treatment group.

	Florfenicolo	Controllo
Morti per mal. respiratoria	0	1 (in G 3)
Moribondi per mal. respiratoria	2 (in G 3)	0
Moribondi per mal. resp. + malattia concomitante	2 (G 2 e G 3)	0
Trattamenti iniettabili per mal. resp.	5	6

Successo terapeutico e preventivo dei due trattamenti in studio

I grafici che seguono sono tutti relativi alle percentuali di successo registrate nello studio, ripartite tra gruppi di trattamento, popolazione malata e a rischio, e per i primi due grafici ripartite anche per sito sperimentale.

Grafico 3. Successo terapeutico (suini malati al Giorno 0)
Graphic 3. Therapeutic success (ill pigs on day 0)

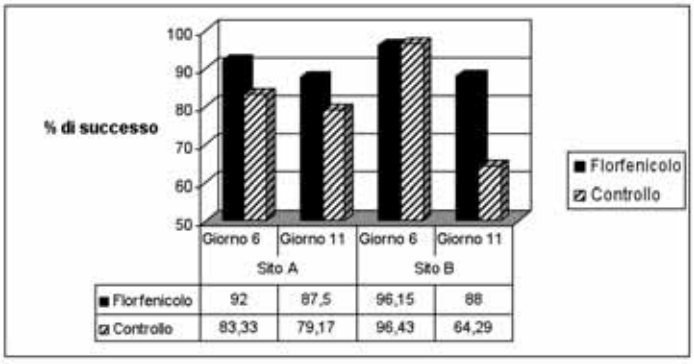


Grafico 4. Successo preventivo (suini clinicamente sani al Giorno 0)
Graphic 4. Preventive success (clinically healthy pigs on Day 0)

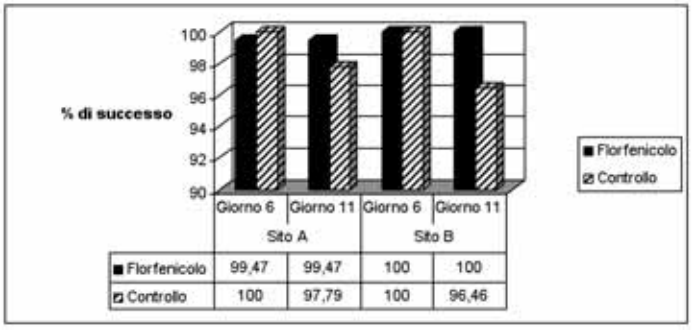
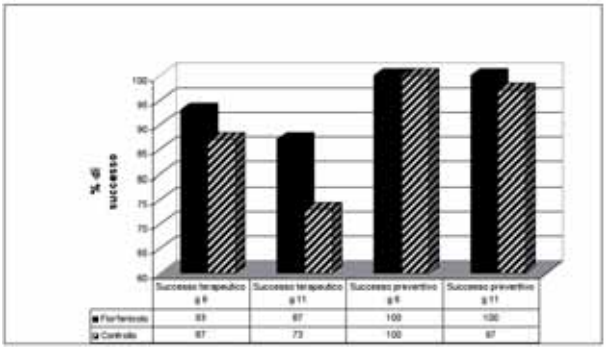


Grafico 5. Percentuali di successo relative ai dati aggregati dei due siti sperimentali, calcolate tenendo conto della numerosità dei suini per sito e per box

Graphic 5. Cumulative success rates, based on the aggregated data of the 2 experimental sites and considering the differences in samples' size of the sites and pens



La tabella 4 esprime anche i limiti di confidenza e analizza la significatività statistica delle differenze tra i due gruppi di trattamento per ognuno degli end-point primari.

Tabella 4. Proporzioni degli endpoint di efficacia primari nelle due popolazioni e nei due gruppi di trattamento ed analisi statistica delle differenze.

Table 4. Rates of the primary efficacy endpoints in the two populations and for the two treatment groups and statistical analysis of the differences.

Variabile	Gruppo	Proporzione	Limite di confidenza inferiore (al 95%)	Limite di confidenza superiore (al 95%)
Successo terapeutico al giorno 6	Controllo	0.8685	0.7290	1.0080
	Florfenicolo	0.9297	0.8056	1.0537
Successo terapeutico cumulativo al giorno 11	Controllo	0.7295	0.5479	0.9110
	Florfenicolo	0.8703	0.7061	1.0345
Successo preventivo al giorno 6	Controllo	1.0000	0.9926	1.0074
	Florfenicolo	0.9967	0.9903	1.0031
Successo preventivo cumulativo al giorno 11	Controllo	0.9721	0.9547	0.9895
	Florfenicolo	0.9971	0.9822	1.0119

Variabile	Differenza	Limite di confidenza inferiore (al 95%)	Limite di confidenza superiore (al 95%)	p
Successo terapeutico al giorno 6	-0.06115	-0.2477	0.1255	0.4849
Successo terapeutico al giorno 11	-0.1409	-0.3855	0.1038	0.2392
Successo preventivo al giorno 6	0.003271	-0.00650	0.01304	0.4556
Successo preventivo al giorno 11	-0.02495	-0.04786	-0.00204	0.0358

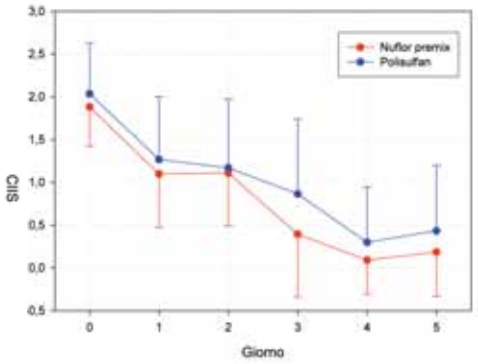
Nota: le percentuali di successo di questa tabella sono relative ai dati aggregati dei due siti sperimentali, calcolate tenendo conto della numerosità dei suini per sito e per box

Sintomatologia clinica e temperatura rettale

I seguenti grafici sono relativi all'evoluzione degli end-points secondari (punteggio clinico complessivo, depressione, dispnea e temperatura rettale), relativamente ai suini malati.

Grafico 6 Punteggio clinico complessivo (popolazione malata)

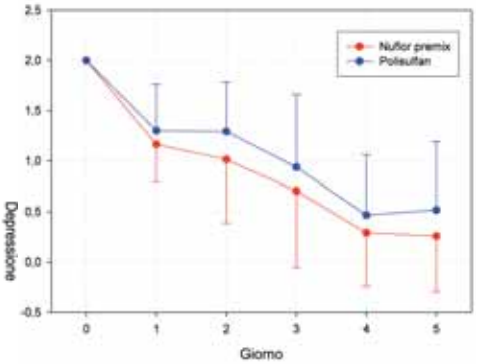
Graphic 6. Clinical Illness Index Score (clinical pigs)



p < 0,05 al giorno 3

Grafico 7. Depressione (popolazione malata)

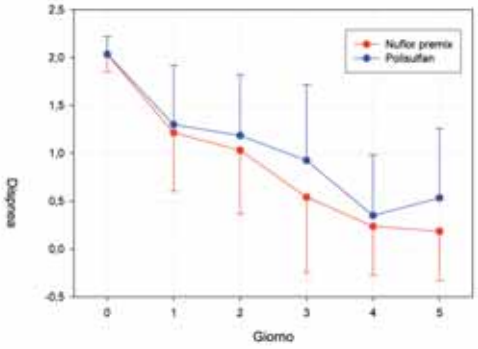
Graphic 7. Depression (clinical pigs)



p < 0,05 al giorno 2 e 5

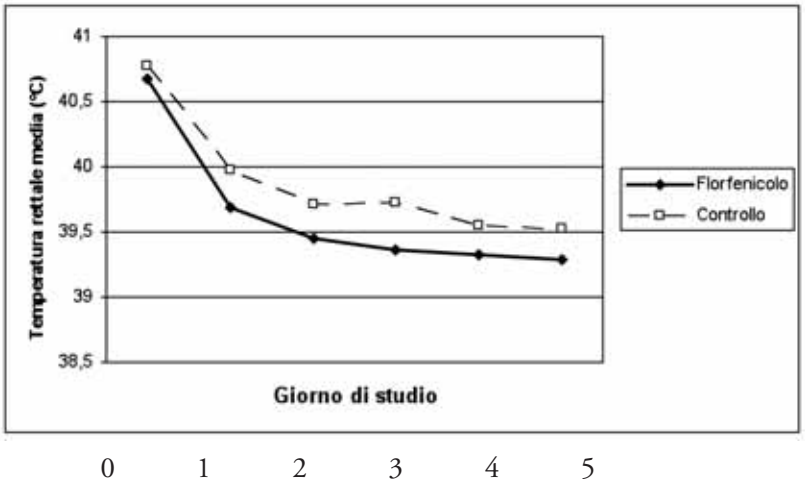
Grafico 8. Dispnea (popolazione malata)

Graphic 8. Dyspnoea (clinical pigs)



p < 0,05 al giorno 3 e 5

Grafico 9. Temperatura rettale (suini malati al giorno 0)
Graphic 9. Rectal temperature (clinical pigs on day 0)



p < 0,05 ai giorni 1,2,3,4,5

Incrementi ponderali e consumi di mangime

Le seguenti tabelle riassumono i risultati per i due siti sperimentali. Relativamente all'incremento ponderale, questo si riferisce al periodo g0 – g11. Per questo parametro è stato possibile eseguire un'analisi statistica, in quanto i box sono stati pesati singolarmente e quindi esisteva una numerosità del campione che lo ha consentito. Il consumo di alimento si riferisce solo al mangime medicato e quindi al periodo g0-g4 (5 giorni di medicazione) e non essendo stato valutato per i singoli box, ma complessivamente per tutto il gruppo di trattamento, non è possibile effettuare l'analisi statistica. Comunque, il consumo è stato identico per i due mangimi medicati nel sito A, e leggermente superiore per il mangime di controllo nel sito B.

Tabella 5. Incremento ponderale giornaliero medio (kg/capo/giorno) dal Giorno 0 al Giorno 11, cumulativo dei due siti sperimentali. La numerosità si riferisce al numero di box.
Table 5. Overall (combined for the 2 trial sites) daily weight gain from Day 0 to Day 11 (kg/pig/day). Pens are the statistical units.

Variabile	Florfenicolo	Controllo	Tutti i suini	Differenza (Intervallo di confidenza al 95 %)	p
Media ± SD (N)	0.55±0.08 (10)	0.5±0.07 (8)	0.53±0.08 (18)	0.05 (-0.02, 0.12)	0.1712
Mediana (Min- Max)	0.53 (0.47 - 0.69)	0.52 (0.41 - 0.59)	0.53 (0.41 - 0.69)		

Tabella 6. Consumo di mangime medicato (giorni 0-4) espresso in kg/capo/giorno
Table 6. Feed consumption (days 0-4) expressed in kg/pig/day

	Florfenicolo	Controllo
Sito A	1,2	1,2
Sito B	1,3	1,4

Tollerabilità

Alcuni casi di diarrea si sono verificati indifferentemente nei due gruppi di trattamento (incidenza giornaliera massima cumulativa dei due siti sperimentali = 0,97%), con scomparsa completa del fenomeno a partire dal giorno 7.
Alcuni casi di infiammazione perianale o di eversione rettale si sono verificati in uno solo dei siti sperimentali (sito A) nel gruppo florfenicolo, con un'incidenza giornaliera massima nel sito in questione pari al 5,61%. L'intensità del fenomeno è diminuita a partire dal giorno 4, con remissione completa in tutti i suini al giorno 7 (3 giorni dopo la fine della medicazione).

DISCUSSIONE

La distribuzione basale degli score di efficacia, da cui si evince che i due gruppi di trattamento sono sufficientemente bilanciati, è riportata in tabella 2. Le analisi statistiche sui dati di efficacia primari dimostrano che la medicazione con il florfenicolo può essere considerata non-inferiore a quella con il prodotto di controllo, contenente una associazione di 2 antibiotici, per quanto riguarda le percentuali di successo terapeutico e di successo preventivo al giorno 11. Per le analisi primarie al giorno 6, l'eccessiva ampiezza dei limiti di confidenza non consente di confermare l'ipotesi di non-inferiorità. Ciò nonostante le analisi rivelano che, se si esclude la percentuale di successo preventivo al giorno 6, le differenza fra le % di successo risultano costantemente a favore del gruppo medicato con il florfenicolo, e addirittura raggiungono la significatività statistica per il successo preventivo al giorno 11. Le analisi condotte sugli endpoint secondari di efficacia (singoli parametri clinici) confermano la tendenza osservata nelle analisi degli endpoint primari; ovvero una generale migliore efficacia di gruppo medicato con il florfenicolo verso il gruppo di controllo, avvalorata dalle sporadiche significatività statistiche costantemente in favore del gruppo medicato con il florfenicolo. Relativamente alla riduzione della temperatura rettale negli animali malati, il gruppo trattato con il florfenicolo ha mostrato una temperatura media significativamente inferiore a quella degli animali del gruppo di controllo per tutto il periodo in cui è stata misurata (giorni 1-5).

CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato l'elevata efficacia clinica del florfenicolo, somministrato mediante il mangime, nel trattamento della Malattia Respiratoria Suina, in condizioni di campo italiane. In particolare, il disegno sperimentale impiegato in questo studio ha

permesso di mettere in risalto separatamente l'efficacia nei soggetti che già mostrano segni clinici di malattia e quella nel trattamento "preventivo" della cosiddetta popolazione a rischio, cioè nei soggetti che ancora non mostrano segni clinici, ma sono a stretto contatto con quelli malati. Tali risultati sono simili a quelli ottenuti nel corso di numerosi studi effettuati con la formulazione iniettabile, e confermano quelli ottenuti all'estero con questa nuova formulazione orale di florfenicolo (3,4).

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dr.ssa Francesca Ottolini, il Sig. Roberto Manara e il Sig. Luca Maraccani, per l'assistenza prestata durante lo studio.
Si ringraziano le Sezioni di diagnostica di Cremona e Parma dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, per l'esecuzione degli esami di laboratorio.
Si ringraziano il Sig. Mario Marzanatti ed il Dr. Erminio Bonizzoni per l'inserimento dei dati su supporto informatico e per l'analisi statistica.

Bibliografia

1. Terreni M., Colzani A., Cevidalli A.E. (2002) *Efficacia clinica del florfenicolo, paragonato all'enrofloxacina, nel trattamento parenterale delle infezioni respiratorie del suino*. Atti XXVIII meeting annuale S.I.P.A.S., 193-197.

2. Cossettini C., Candotti P., Rota Nodari S., Cevidalli A.E. (2003) *Studio comparativo di efficacia di florfenicolo e danofloxacina iniettabili nel trattamento delle infezioni respiratorie del suino*. Atti XXIX meeting annuale S.I.P.A.S., 419-428.

3. De Haas V., Fleck R. (2006). *Efficacy of a florfenicol (NUFLOR) feed premix compared to amoxicillin feed premix for the treatment of porcine respiratory disease (PRD) in Europe*. Proceedings of the Schering-Plough Animal Health Symposium at the 19th IPVS Congress, p 24.

4. Simmons R.D., Zhou C. (2006). *Efficacy of NUFLOR feed premix for the control of swine respiratory disease (SRD) in the US.* Proceedings of the Schering-Plough Animal Health Symposium at the 19th IPVS Congress, p 25.

DINAMICA SIEROLOGICA DELL'INFEZIONE DA *PRRSV E MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN UN GRUPPO DI SCROFETTE DI UN'AZIENDA DA RIPRODUZIONE.

SEROLOGICAL DYNAMIC OF PRRSV AND MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE INFECTIONS IN A GROUP OF GILTS FROM A FARROW-TO-WEANER HERD.

DE MATEO AZNAR, M.[1], [2]; CEGLIE L.[1]; CARNIELETTO P. [1]; BORTOLETTO G. [3]; ROSSETTO G.[4]; DRIGO M[3].; NARDELLI S[1].

[1]***Istituto Zooprofilattico delle Venezie – Legnaro (PD);***
[2]***Scuola di Specializzazione in Patologia Suina - Università degli Studi di Parma;***
[3]***Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Università degli Studi di Padova;***
[4]***Veterinario libero professionista (Pordenone);***

Parole chiave: PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, sierologia, ELISA, acclimatamento, suino

Key words: PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, serology, ELISA, acclimatization, swine

Riassunto. Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) e il *Mycoplasma hyopneumoniae* sono considerati due dei più importanti patogeni associati alla sindrome respiratoria nell'industria suinicola. La dinamica dell'infezione di PRRSV, sia a livello sierologico (ELISA) che virologico (RT-PCR), è stata valutata in 15 scrofette di una azienda suina da riproduzione per un periodo di 18 mesi. Gli stessi campioni di siero sono stati usati per confrontare l'andamento anticorpale verso *M. hyopneumoniae* mediante due kit ELISA commerciali, indiretto e competitivo, per valutare il loro uso a fini diagnostici soprattutto nel confronto della vaccinazione. I risultati riguardanti la PRRS hanno evidenziato l'infezione di tutti i soggetti durante il periodo d'acclimatamento e la reinfezione dopo quasi un anno con un ceppo eterologo introdotto posteriormente in allevamento. Il confronto dei kit ELISA per la ricerca degli anticorpi verso *M. hyopneumoniae* ha rilevato una moderata correlazione tra i kit, con un livello di reattività marcatamente inferiore nella reazione indiretta, e una dinamica non correlata alla vaccinazione.

Abstract. The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* are considered two of the most important pathogens associated to respiratory syndrome in the swine industry. The PRRSV infection's dynamic has been studied on 15 gilts, both through serology (ELISA) and virology (RT-PCR), in a swine reproduction farm for 18 months. The same serum samples have been used to compare the dinamic of antibodies against *M. hyopneumoniae* through two commercial ELISA kits, indirect and competitive, to evaluate their use for diagnosis purposes especially in case of vaccination. The results concerning PRRS have shown that all the subjects have been infected during the acclimatization and that a reinfection occurred after almost one

year with an heterologous strain introduced later in the farm. The comparison of the two ELISA kits for the detection of antibodies against *M. hyopneumoniae* has shown a moderate correlation between the two kits, with a reactivity level strongly lower in the indirect reaction, and a dynamic not correlated to vaccination.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le patologie respiratorie nel suino hanno acquisito un'importanza rilevante per le ingenti perdite economiche da esse causate e dovute principalmente al calo dei parametri produttivi, all'elevata mortalità e ai costi dei medicinali. Il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV) e il *Mycoplasma hyopneumoniae* sono considerati tra i principali agenti responsabili delle malattie respiratorie nelle aziende suine (Thacker et al., 1998). Per queste ragioni l'industria suinicola cerca di ottimizzare le strategie di prevenzione e controllo, basate sulla gestione aziendale o in combinazione alla vaccinazione e ai trattamenti antibiotici mirati.
La PRRS è una delle malattie infettive del suino più importanti in gran parte del mondo manifestandosi con sintomi respiratori dallo svezzamento all'ingrasso ed episodi abortivi tardivi nelle scrofe. L'epidemiologia di questa malattia è assai complicata perché il virus presenta caratteristiche molto particolari quali l'elevata variabilità genetica e la capacità di produrre infezioni persistenti. La conoscenza della trasmissione e della persistenza del virus sono indispensabili per avere successo nel limitare i danni causati dalla malattia.
L'obiettivo del controllo della PRRS si basa sulla stabilizzazione del reparto riproduttivo, in modo da impedire la trasmissione tra scrofe o tra scrofa e suinetto. Gli allevamenti virologicamente instabili sono il risultato dell'introduzione di una rimonta mal acclimatata o infetta e per evitarlo sono state messe a punto diverse strategie di controllo basate sulla vaccinazione e/o quarantena e acclimatamento della rimonta. L'acclimatamento della rimonta consiste nell'esposizione dei nuovi riproduttori allo stipite presente in allevamento prima d'entrare in produzione (Dee et al., 1996). Le modalità d'esposizione sono principalmente due: la sieroinfezione e il contatto diretto con animali infetti dell'allevamento. La sierologia e la rilevazione del virus mediante RT-PCR sono utili strumenti per valutare la dinamica dell'infezione della PRRS nella rimonta (Batista, 2005)
La vaccinazione è uno strumento notevolmente diffuso per il controllo delle infezioni da *M. hyopneumoniae*. I principali benefici della vaccinazione sono la riduzione dei sintomi clinici, delle lesioni polmonari e dei costi dei medicinali e il miglioramento dei parametri produttivi (Maes et al., 2008). A livello del reparto riproduttivo, la vaccinazione delle scrofette è raccomandata in allevamenti infetti endemicamente per evitare la destabilizzazione dell'immunità (Bargen, 2004)
L'efficacia della vaccinazione varia tra individui e non è stata dimostrata la correlazione tra concentrazione di anticorpi nel siero e protezione verso l'infezione da *M. hyopneumoniae* (Thacker et al., 1998). La risposta anticorpale dopo la vaccinazione varia tra vaccini e, in assenza d'infezione naturale, diminuisce sotto i livelli di rilevazione dopo 1-3 mesi (Maes et al., 2008). In linea generale, la percentuale di animali che sieroconvertono dopo la vaccinazione non è molto elevata (Sibila et al., 2004)
Questo lavoro ha lo scopo di valutare: 1) la dinamica dell'infezione da PRRSV in un gruppo di 15 scrofette in un allevamento convenzionale per un periodo di 1,5 anni, assai

più prolungato di quelli riportati in bibliografia; 2) la risposta anticorpale verso *M. hyopneumoniae*, in relazione ai trattamenti vaccinali ed alla reazione sierologica utilizzata.

MATERIALE E METODI

Allevamento

Le scrofe analizzate appartengono ad un allevamento da riproduzione a ciclo aperto localizzato in pianura Padana, con circa 1500 scrofe produttive. L'azienda è positiva per PRRSV e la circolazione virale avviene principalmente nei reparti svezzamento/magronaggio. Il tasso di rimonta è del 40% e consiste nell'introduzione di scrofette di 3-4 settimane d'età e peso di 6 kg provenienti da un centro genetico PRRS negativo e con rare lesioni da *Mycoplasma hyopneumoniae*. In tale azienda è previsto un programma d'acclimatamento lungo 6-7 mesi per facilitare l'infezione delle scrofette prima dell'entrata in produzione. Questo programma d'acclimatamento prevede le seguenti fasi:

- Tre settimane nel reparto svezzamento a contatto diretto con i suinetti presenti.
- Cinque settimane nel reparto magronaggio a contatto diretto con i magroni presenti.
- Tre mesi nel reparto accrescimento a contatto diretto con i suinetti dello svezzamento; questi sono utilizzati come eliminatori eventuali di virus e vengono sostituti ogni 2 settimane per cercare di garantire il massimo delle possibilità di infezione con il ceppo di PRRS presente in allevamento.
- Alla fine di questi 3 mesi, le scrofette vengono spostate in un reparto di stimolazione, fecondate e mai più spostate fino all'entrata in sala parto. Questo accorgimento consente di tenere separate le pluripare dalle primipare riducendo la possibilità di trasmissione virale tra animali di diverso status sierologico.

L'azienda è inoltre storicamente positiva per la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Per quanto riguarda il piano vaccinale, è da segnalare che sono previsti 3 interventi (a 4, 7 e 12 settimane) con un vaccino commerciale verso *Mycoplasma hyopneumoniae*. Non è invece prevista la vaccinazione verso la PRRS.

Campionamento

In questa ricerca sono state campionate longitudinalmente le scrofette di un gruppo di rimonta dal momento della loro entrata in azienda per un periodo di circa un anno e mezzo. Sono stati prelevati 18 campioni di sangue intero per animale rispettando il seguente schema:

- Dalla 4ª alla 13ª settimana di vita: prelievo di sangue settimanale
- Dalla 13ª settimana di vita fino alla fine dello studio: prelievi di sangue trimestrali.

Il giorno di arrivo in azienda (4 settimane di vita) sono state scelte casualmente 15 scrofette da un totale di 52. Purtroppo 2 animali hanno perso l'orecchino dopo la venticinquesima settimana di vita, al momento della entrata in produzione, e quindi il numero di animali rimasti disponibili per lo studio longitudinale sono 13.

Indagini di laboratorio

I campioni sono stati processati in laboratorio entro le 24 ore dal prelievo. Il siero ottenuto dopo centrifugazione a 3000 rpm/min per 10 minuti a + 4°C, è stato aliquotato e congelato in attesa dell'esecuzione dell'ELISA e della Reverse Transcription-Polymerase

Chain Reaction (RT-PCR). In totale sono stati analizzati 255 campioni di sangue.

• RT-PCR PRRS

La metodica amplifica un frammento in posizione 3'-terminale della regione conservata localizzata nell'ORF 7 sia del ceppo virale US che di quello EU mediante una PCR-multiplex 2-step (Persia et al., 2001)

I campioni di siero sono stati analizzati in pool fino a un massimo di 5 campioni e in caso di pool positivo è stata eseguita la RT-PCR sul campione singolo.

• ELISA

La ricerca degli anticorpi verso PRRSV è stata compiuta con un kit commerciale HerdCheck® PRRS ELISA 2X Idexx Laboratories-USA. La presenza o assenza di anticorpi si basa sul rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P): il campione è considerato positivo quando S/P ≥ 0,40. Per l'esecuzione dell'analisi sono state seguite le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

La ricerca degli anticorpi verso Mycoplasma hyopneumoniae è stata fatta con 2 kit ELISA commerciali. Per l'esecuzione dell'analisi sono state seguite le istruzioni fornite dalla ditta produttrice:

- indiretto: HerdCheck® *Mycoplasma hyopneumoniae* Idexx Laboratories-USA. La presenza o assenza di anticorpi si basa sul rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P): i campioni con un valore S/P ≥ 0,4 sono stati riconosciuti come positivi, quelli < 0,3 come negativi e i valori compresi tra 0,3 e 0,4 come dubbi.
- competitivo: Mycoplasma hyopneumoniae ELISA, Oxoid, UK (in passato conosciuto come DAKO). L'interpretazione dei risultati si bassa nel confronto tra il siero in esame e il controllo antigene 100 % (AG100%): valore di % d'inibizione (% I) ≥ 50 % dell'AG100% sono considerati positivi; % I < 35% dell'AG 100% sono considerati negativi; valori di % I tra 35 e 50% AG 100% sono stati ritenuti dubbi.

Analisi statistica

• Concordanza tra i kit ELISA: valore *kappa*

Il coefficiente *kappa di Cohen* è un metodo che determina la concordanza tra due osservazioni o test oltre la casualità. Si deve considerare che il coefficiente kappa misura la forza della concordanza tra i test: questo non fornisce una comparazione con il "gold standard" o uno stato conosciuto di malattia.

RISULTATI

Infezione da PRRSV
La dinamica dell'infezione della PRRS è rappresentata nel grafico 1.

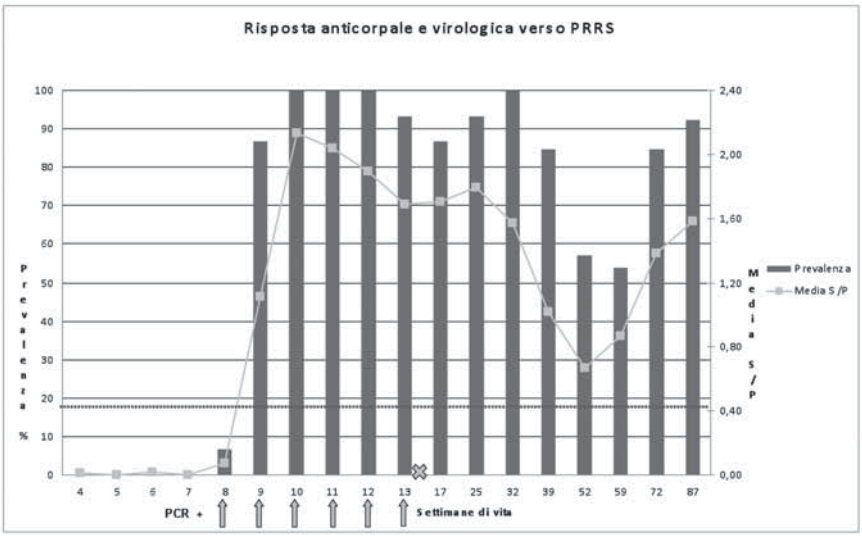


Grafico 1: Dinamica dell'infezione della PRRS mediante ELISA e RT-PCR
Graphic 1: Infection dynamic of PRRS by ELISA and RT-PCR

Si possono distinguere 2 fasi:

- Fase 1 (dalla 4ª fino alla 52ª settimana di vita):
  Tutti gli animali s'infettano con PRRSV del genotipo Europeo allo spostamento nel magronaggio. La maggior parte degli animali presenta una viremia di 4 settimane; soltanto 2/15 animali rimangono viremici per 3 settimane e 2/15 per 5 settimane.
  La sieroconversione avviene in parallelo alla viremia: 13/15 animali sieroconverte a 9 settimane di vita, quando 14/15 sono viremici. A 13 settimane, soltanto 1/15 animali rimane viremico. Finito il periodo di viremia, gli anticorpi calano progressivamente.
- Fase 2 (dalla 59ª fino alla 87ª settimana di vita):
  A 1 anno di vita circa (59 settimane) la prevalenza si attesta al 54% (7/13) con un valore medio S/P = 0.87. In questo momento la situazione è molto variabile da capo a capo con 5/13 animali con valore medio S/P tra 0 e 0.1 e 5/13 con S/P> 1 (dati non mostrati). Dopo la 59a settimana si osserva un aumento della prevalenza e del valore medio S/P fino alla fine del periodo d'osservazione ma non è stato riscontrato alcun pool positivo per PRRSV.

Infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*
La dinamica sierologica del *Mycoplasma hyopneumoniae* è rappresentata nel grafico 2 (kit indiretto) e 3 (kit competitivo).

Grafico 2: Dinamica sierologica dell'infezione da M. hyopneumoniae mediante ELISA indiretto

Graphic 2: Dynamic of M. hyopneumoniae antibody levels by indirect ELISA

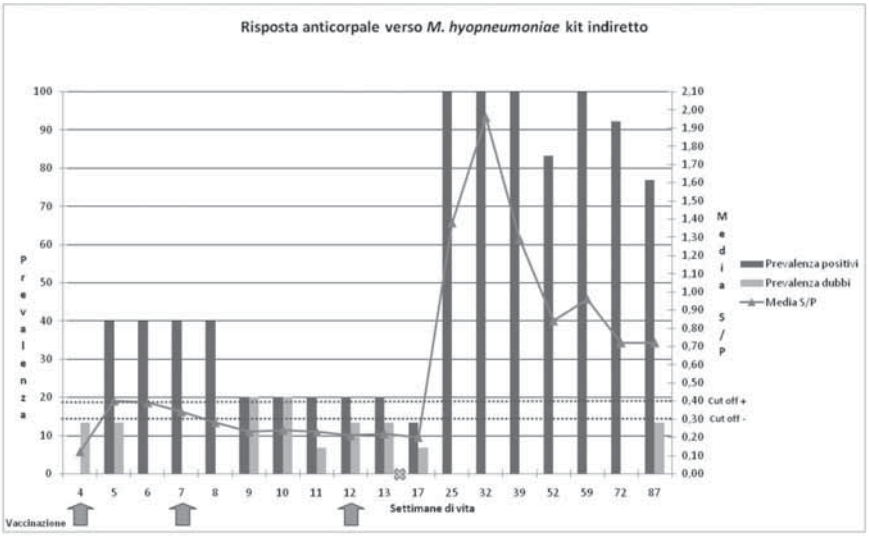
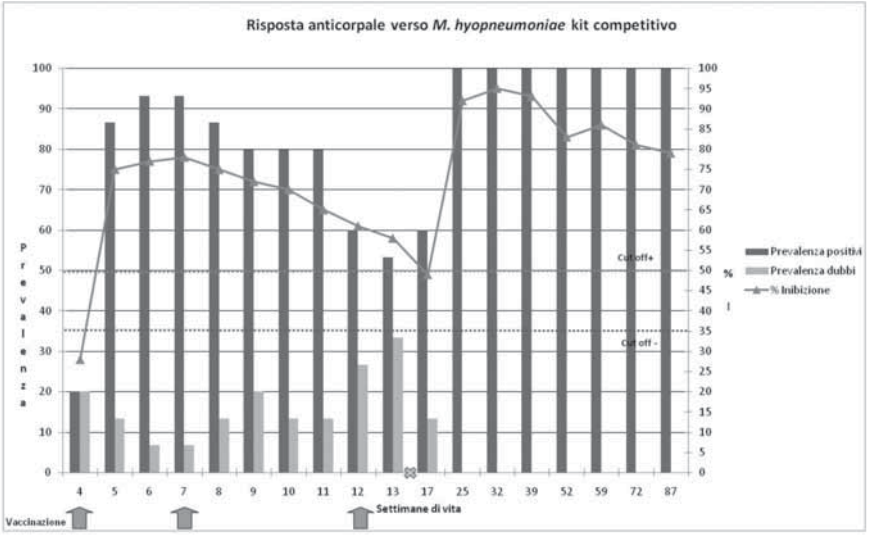


Grafico 3: Dinamica sierologica dell'infezione da M. hyopneumoniae mediante ELISA competitivo

Graphic 3: Dynamic of M. hyopneumoniae antibody levels by competitive ELISA



Si possono distinguere 2 fasi:

- Fase 1 (dalla 4ª alla 17ª settimana di vita):
  Le scrofette all'arrivo presentano un livello di anticorpi basso per entrambi i kit, addirittura quasi nullo per il kit indiretto.
  Dopo 1 settimana dall'entrata in allevamento si osserva per entrambi i kit un innalzamento tanto della prevalenza quanto del valore medio S/P e di % I. Questo innalzamento è molto evidente per il kit competitivo a 7 settimane di vita, arrivando a un valore massimo di prevalenza del 93% e di % I del 78%. Per il kit indiretto, i valori massimi, anche se di modesta entità, si raggiungono più precocemente, a 5 settimane di vita con un valore medio S/P di e prevalenza del 53%.
  Il secondo e terzo intervento vaccinale a 7 e 12 settimane di vita non comportano nessun incremento dei valori in entrambi i kit. Per il kit competitivo tanto la prevalenza quanto la % I calano progressivamente fino alla 17ª settimana di vita anche se la % I si mantiene comunque nel range di positività. Invece per quanto riguarda il kit indiretto, i valori di prevalenza e di S/P medio calano subito dopo la 5ª settimana di vita, negativizzandosi dalla 8ª settimana di vita in poi.
- Fase 2 (dalla 17ª fino alla 87ª settimana di vita):
  Dalla 25ª settimana entrambi kit dimostrano il 100% prevalenza e a 32 settimane si raggiungono i valori massimi di S/P medio = 1.96 e % I = 95.
  Dopo questa evidente sieroconversione, il kit competitivo mantiene valori molto elevati di prevalenza e di % I fino alla fine dello studio. Anche il kit indiretto dimostra alti livelli di prevalenza (80%) fino alla fine dello studio, ma, pur mantenendosi sopra il cut-off presenta un marcato calo del valore S/P medio (0.72).

Il riassunto dei risultati di entrambi kit è rappresentato nella tabella 1.

Esito		**Indiretto**			**Totale**
		Positivi	**Dubbi**	**Negativi**	
Competitivo	**Positivi**	121	16	64	201
	Dubbi	0	1	26	27
	Negativi	0	1	22	23
Totale		121	18	112	251

Tabella 1: Risultati ottenuti dall'analisi sierologica verso M. hyopneumoniae effettuata con i kit ELISA indiretto e competitivo (251 campioni)
Table 1: M. hyopneumoniae serological results by indirect and competitive ELISA

La concordanza tra i kit calcolata mediante il valore kappa è moderata: k = 0.246 (CL 95% 0.175 – 0.317, p=0,036). L'analisi delle discordanze rivela che il kit competitivo presenta un maggior numero di positivi in confronto al kit indiretto. Il 43% (107/251) dei campioni presenta discordanza, l'87% (93/107) dei quali in fase 1, dove il 73% (68/93) sono positivi al kit competitivo e dubbi/negativi per il kit indiretto. I 14 campioni discordanti in fase 2 appartengono a due categorie di animali: quelli all' inizio della seconda sieroconversione e quelli alla fine dello studio, fase peraltro nella quale i titoli sono decisamente in calo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

PRRSV

L'avvenuta infezione, dimostrata mediante sieroconversione e viremia da parte della totalità delle scrofette prelevate in questo studio, indica che il programma d'acclimatamento nei confronti del PRRSV è stato efficace. I risultati sierologici (inizio sieroconversione dopo 2-3 settimane dall'entrata nel magronaggio) e virologici (1 mese di viremia) concordano, in termine di livelli e durata, con i dati di altre ricerche simili (Batista et al., 2004). La fase 1 può essere considerata il risultato del programma d'acclimatamento.

La fase 2 è l'effetto dell'introduzione di un ceppo eterologo in azienda dimostrata da: innalzamento dei valori anticorpali nelle scrofe in studio, aumento dei processi abortivi in tutte le categorie di scrofe dell'allevamento durante le 52ª e 72ª settimana di vita delle scrofe in studio, viremia nei suinetti sotto scrofa 3 mesi dopo la sieroconversione delle scrofe e l'analisi filogenetica dei ceppi di PRRSV (dati non mostrati). La mancata rilevazione di PRRSV nelle scrofe in studio tra le 52 e le 59 settimane può essere dovuta al fatto che le reinfezioni possono dare viremia con durata inferiore rispetto alla prima infezione e che la finestra temporale tra i prelievi è stata di 7 settimane.

Purtroppo la mancata presenza di un gruppo di controllo all'interno dello stesso allevamento non permette di confrontare le performance riproduttive.

Mycoplasma hyopneumoniae

L'impiego di due diversi kit sullo stesso gruppo di campioni permette di evidenziare una frequenza di esito positivo nettamente superiore nella reazione competitiva rispetto a quella indiretta, situazione che si traduce in una concordanza moderata tra i test. Perciò a fini diagnostici non si può considerare equivalente l'impiego dell'uno o dell'altro kit. Questo riscontro è attribuibile alla diversa sensibilità riportata per i due kit (Erlandson et al., 2005).

La dinamica anticorpale nel tempo non si dimostra associabile agli interventi vaccinali: delle due sieroconversioni, una si manifesta in assenza di vaccinazioni e inoltre alle 2 vaccinazioni di richiamo non corrisponde alcun rialzo anticorpale. Quest'andamento è in linea con quanto già osservato da Gradellini et al. (2008) in un lavoro che ha riguardato un arco temporale più breve e in cui i prelievi sono iniziati immediatamente dopo il secondo intervento vaccinale.

La non disponibilità del dato di PCR non consente di associare con certezza i due rialzi anticorpali con la presenza attiva del Mycoplasma, ma questa appare la spiegazione più plausibile. Merita comunque attenzione la coincidenza temporale fra sieroconversione verso *M. hyopneumoniae* e la movimentazione degli animali: la prima conversione è coincisa infatti con l'arrivo in azienda, mentre la seconda con il passaggio delle scrofette nel reparto di fecondazione.

References

Bargen L.E., (2004) "A System Response to an Outbreak of Enzootic Pneumonia in grow/finish Pigs" Can. Vet. J., 45, 856-859.

Batista L., (2005) "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Diagnostics in the Breeding Herd: Back to the Basics." J. Swine Health Prod., 13, 96-98.

Batista L., Pijoan C., Dee S., Olin M., Molitor T., Joo H.S., Xiao Z., Murtaugh M., (2004) "Virological and Immunological Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in a Large Population of Gilts" Can. J. Vet. Res., 68, 267-273.

Dee S.A., Joo H.S., Henry S., Tokach L., Park B.K., Molitor T., Pijoan C., (1996) "Detecting Subpopulations After Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Large Breeding Herds using Multiple Serologic Tests" J. Swine Health Prod., 4, 181-184.

Erlandson K.R., Evans R.B., Thacker B.J., Wegner M.W., Thacker E., (2005) "Evaluation of Three Serum Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for *Mycoplasma Hyopneumoniae*." Journal of Swine Health and Production, 13, 198-203.

Gradellini S., Nardellini S., Mazzoni C., Borri E., De Mateo Aznar M., Ceglie L., Granato A., Boscarato M., Schiavon E., Tonon F., (2008) "Dinamica Dell'Infezione Di Mycoplasma Hyopneumoniae e PRRS Virus in Un Allevamento a Ciclo Chiuso Con Sistema Di Svezzamnento a Bande Trisettimanali." Atti XXXIV Meeting Annuale SIPAS, 479-492.

Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F., (2008) "Control of Mycoplasma Hyopneumoniae Infections in Pigs" Vet. Microbiol., 126, 297-309.

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." Proceedings of the 10th International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, 440-441.

Sibila M., Calsamiglia M., Vidal D., Badiella L., Aldaz A., Jensen J.C., (2004) "Dynamics of Mycoplasma Hyopneumoniae Infection in 12 Farms with Different Production Systems" Can. J. Vet. Res., 68, 12-18.

Thacker E., Thacker B.J., Boettcher T., Jayappa H., (1998) "Comparison of Antibody Production, Lymphocyte Stimulation and Production Induced by Four Commercial *Mycoplasma Hyopneumoniae bacterins*" J. Swine Health Prod., 6, 107-112.

IL SUINO NERO DEI NEBRODI QUALE POSSIBILE SERBATOIO DELLA TUBERCOLOSI ALL'INTERNO DI UN'AREA PROTETTA (PARCO DEI NEBRODI): ESPERIENZE PERSONALI IN SEI ANNI DI SORVEGLIANZA (2003-2008)

NEBRODI BLACK PIGS AS POSSIBLE RESERVOIR OF TUBERCULOSIS IN THE NEBRODI PARK: PERSONAL INVESTIGATIONS BETWEEN 2003-2008

DI MARCO VINCENZO, MARIANELLI CINZIA*, CIFANI NOEMI*, ARONICA VINCENZO, FIASCONARO MICHELE, RUSSO MIRIAM, AMEDEO STEFANO, CATALANO DEBORAH**, GUARDA FRANCO***, CAPUCCHIO MARIA TERESA****

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Barcellona P.G. (Messina) Via S. Andrea 96, 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italia
Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma
****Dipartimento di Patologia Animale, Facolta' di Medicina Veterinaria, Universita' degli Studi di Torino, Via Leonardo Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italia***
*****Centro di Referenza Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Patologia Animale, Facolta' di Medicina Veterinaria, Universita' degli Studi di Torino, Via Leonardo Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italia***

Parole chiave: suino Nero, tubercolosi, diagnosi anatomo-patologica, serbatoio, Parco Nebrodi

Key words: feral Black pig, tuberculosis, pathological diagnosis, reservoir, Nebrodi park

Riassunto. Gli autori riportano i risultati di un piano di monitoraggio sanitario svolto negli anni 2003-2008 sul territorio del parco al fine di valutare il ruolo del Suino Nero dei Nebrodi nella diffusione della tubercolosi nell'area protetta. 1693 suini Neri di età compresa tra i 4 mesi e i 7 anni sono stati sottoposti ad esame anatomo-istopatologico. N° 122 (7,21%) animali sono risultati positivi per lesioni ascrivibili a tubercolosi. All'esame biomolecolare tutti i soggetti esaminati sono risultati positivi per *Mycobacterium bovi*s. Le lesioni piu' frequenti coinvolgevano i linfonodi sottomandibolari e retro faringei; lesioni generalizzate erano pero' presenti nel 56% degli animali. L'alta percentuale di lesioni generalizzate, l'estensione delle lesioni polmonari, la giovane età degli animali con tubercolosi generalizzata (spesso inferiore a 2 anni) con lesioni maggiori di 1 cm (76%), permettono di ipotizzare che il suino Nero dei Nebrodi possa trasmettere la malattia ad altre specie, agendo così come un vero serbatoio della tubercolosi nel Parco.

Abstract. The authors report the results of a surveillance programme performed during 2003-2008 years to evaluate the role of feral Nebrodi Black pig in the diffusion of the tuberculosis in the protected area of the Nebrodi park. 1693 Nebrodi Black pigs, aging between 4 months to 7 years, were submitted to anatomo-pathological examination. N°

122 (7.21%) animals showed tuberculosis compatible lesions. Molecular investigations confirmed the presence of *Mycobacterium bovis*. The lesions involved expecially the submandibolar lymph nodes, but generalized lesions were present in 56% of pigs. The high number of generalized lesions, the severe involvement of the lungs, the age of the majority of the animals with generalized lesions (less than 2 years), permit to consider feral Black pig as possible reservoir of tuberculosis in the Nebrodi park

INTRODUZIONE

La percentuale di allevamenti infetti con tubercolosi nell'italia meridionale e insulare è ancora elevata. In Sicilia, ancor più che nel resto d'Italia, l'obiettivo dell'eradicazione è ben lungi dall'essere raggiunto, anzi, attualmente, la regione è in un'emergenza sanitaria (O.M. 14/11/2006). La Sicilia, infatti, è tra le regioni italiane quella che detiene il primato negativo per la presenza della TB in campo animale con una positività di circa il 6% nel bovino e del 7% circa nel Suino Nero dei Nebrodi (Di Marco et al., 2004, 2005, 2006a. 2006b, 2007c, 2008, Marianelli et. al., 2008).
Nell'espletamento di un piano di eradicazione per la tubercolosi uno dei punti critici è la precoce individuazione di reservoir di *Mycobacterium bovis* nella fauna selvatica. Infatti è stato da tempo dimostrato che il fallimento nell'eradicazione della tubercolosi nel bovino in alcune nazioni è riconducibile alla presenza di specie selvatiche serbatoio dell'infezione che possono comportarsi come ospiti di mantenimento o animali sentinella (spillover), indicatori della circolazione di micobatteri in un territorio (Nugent et al., 2002). Il suino è recettivo nei confronti di diverse specie di micobatteri, *Mycobacterium tubercolosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. Nei Paesi, fra cui l'Italia, dove gli allevamenti bovini sono stati pressoché totalmente risanati da tubercolosi, la patologia suina è sostenuta da *Mycobacterium avium* in più del 70% dei casi, mentre il ritrovamento di *Mycobacterium bovis* è diventato rarissimo. La tubercolosi da *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tubercolosis* è stata segnalata in Liguria nei cinghiali (Mignone et al., 1995; Dini et al.,2003), probabilmente trasmessa attraverso la condivisione dei pascoli con i bovini, o da cinghiali infettatisi con materiale d'origine umano proveniente da discariche fognarie prive di impianti di depurazione o a cielo aperto. Pertanto, ai fini del raggiungimento dell'obiettivo, è importante e strategico approntare un piano eradicazione specifico ed adeguato al territorio di intervento. La presenza, nell'area nebroidea, di un sistema zootecnico caratterizzato da allevamenti misti (bovini, ovini, caprini e suini) e di una ricca fauna di animali selvatici o allevati allo stato brado (suino nero, cinghiale, ghiro, furetto, volpe, etc.,), impone un'approfondimento sul ruolo che queste specie domestiche e selvatiche possono avere nel mantenimento e nella trasmissione della tubercolosi all'interno del Parco dei Nebrodi. Il controllo della tubercolosi in specie selvatiche e la prevenzione del contatto tra fauna selvatica e gli allevamenti bovini, in particolare nel caso dei suidi selvatici, potrebbe essere considerata pertanto una priorità per il controllo della tubercolosi in un determinato territorio (Parra et al., 2003, 2005; Aranaz et al., 2004; Gortazar et al., 2005; Vicente et al., 2006, 2007). La mera presenza dell'infezione in una popolazione di selvatici non necessariamente impone a tale specie selvatica la caratteristica di "reservoir" (o riserva) dell'infezione. I cinghiali e i suini selvatici sono stati spesso considerati spillover o ospiti a fondo cieco piuttosto

che veri serbatoi, ma le prove scientifiche a supporto di questa ipotesi sono contraddittorie (Serraino et al., 1999; Machackova et al., 2003; Corner, 2006). Per questo motivo, è importante distinguere tra ospite di mantenimento o serbatoio e spillover. Ospite di mantenimento è quello che può mantenere l'infezione in una zona in assenza di trasmissione crociata da altre specie di selvatici o domestici. Esempi di specie selvatiche a vita libera, che rappresentano questa tipologia d'ospite per *M. bovis*, sono il tasso (*Meles meles*), il cervo a coda bianca (*Odocoileus virginianus*), il bufalo africano (*Syncerus caffe*r), il marsupiale tricosuro volpino (*Trichosurus vulpecula*) e il bisonte (*Bison bison*). Spillover sono invece ospiti che hanno bisogno di una continua fonte di contagio da altre specie per mantenere l'infezione (Morris et al., 1994). Queste specie fungono da animali sentinelle e sono indicatori della circolazione di micobatteri in un territorio; tra loro è generalmente incluso il cinghiale, anche se il suo ruolo non è stato ancora definito in modo certo. Ospiti di mantenimento e spillover possono agire come vettori della malattia (Corner, 2006) trasmettendola ad altre specie.
Scopo della presente ricerca è stato effettuare un piano di monitoraggio sanitario sul territorio del parco al fine di valutare il ruolo del Suino Nero dei Nebrodi nella diffusione della tubercolosi nell'area protetta.

MATERIALI E METODI

Complessivamente nel periodo dal 2003 al 2008 sono stati sottoposti ad esame anatomo-istopatologico n°1693 suini Neri dei Nebrodi di età compresa tra i 4 mesi e i 7 anni di entrambi i sessi.
Dopo la macellazione gli animali sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico accurato. Relativamente, inoltre, su n°25 soggetti macellati nel 2008, è stata effettuata una classificazione delle lesioni in base alle dimensioni (inferiori ad 1 cm -lesione A e superiori ad 1 cm - lesione B) e alla distribuzione (singola regione, due regioni e tutte le regioni). Dopo accurato esame autoptico, gli organi sede di lesione sono stati campionati e parte fissati in formalina tamponata, parte congelati -20 C° per le indagini colturali e PCR. In base a quanto riportato in letteratura per il cinghiale (Bollo et al., 2000; Martin-Hernando et al., 2007) le lesioni istologiche sono state classificate in base al tipo di cellule infiammatorie presenti e alla presenza/assenza di calcificazioni e capsula. Le tipologie di granulomi prese in considerazione sono state le seguenti: granuloma 1, di tipo iniziale composto da cellule infiammatorie mononucleate senza core necrotico; granuloma 2 necrotico, tipico granuloma tubercolare con centro necrotico e cellule di Langhans; granuloma 3, necrotico debolmente calcificato.

RISULTATI

N° 122 (7,21%) animali sono risultati positivi per lesioni ascrivibili a tubercolosi.
Macroscopicamente le lesioni più frequenti sono state osservate nei linfonodi sottomandibolari e retro faringei analogamente a quanto riportato in letteratura nel cinghiale (Martin-Hernando et al., 2007; Naranjio et al., 2008). Infatti i linfonodi della testa rappresentano la sede di più frequente riscontro di lesioni, sia nelle forme localizzate che nelle forme generalizzate. Suddetti linfonodi presentavano quasi sem-

pre noduli multipli con un centro di necrosi caseosa spesso associata a calcificazione, circondati da una reazione connettivale. Il tessuto circostante appariva iperplastico ed iperemico. Le dimensioni dei noduli variavano da 1 mm a 3-4 cm di diametro. Al taglio spesso i granulomi assumevano un caratteristico aspetto raggiato. Oltre a questi noduli multipli si osservavano lesioni di dimensioni variabili da noduli miliari a noduli di alcuni cm di diametro, spesso confluenti tra loro e di colore biancastro. Anche in questi casi era sempre presente un'area di necrosi caseo-calcifica centrale, ma non si osservava la tipica struttura raggiata. In altri casi si riscontravano sempre a livello linfonodale delle lesioni focali raggi ate.
Nei polmoni si osservavano noduli miliari ***(Polmonite tubercolare)*** confluenti che determinavano focolai globulari con centri caseosi calcificati o fluidificati con aspetto ascessuale.
Nel fegato si rilevavano lesioni nodulari singole o confluenti di tipo fibro-caseo-calcifiche.
Il parenchima splenico presentava delle lesioni nodulari nodose con aspetto sclero-caseo-calcifico in corso di generalizzazione precoce protratta per via ematogena. In alcuni casi erano presenti noduli tubercolari sulla sierosa e nel parenchima splenico nella generalizzazione precoce protratta per via linfoematogena, in altri casi noduli tubercolari sulla sierosa nella generalizzazione precoce protratta per via linfogena.
Relativamente rare sono state le localizzazioni riscontrate al tessuto osseo ***(Osteomielite tubercolare caseosa)***, specialmente alle vertebre soprattutto nella generalizzazione protratta nodulare-nodosa, caratterizzata dalla confluenza nella spongiosa di più tubercoli che formavano un conglomerato di varie dimensioni, da un pisello ad una noce di aspetto necrotico-caseoso e calcifico.
Molto rare sono state le localizzazioni riscontrate al surrene, alla vescica ed alla parete dello stomaco.
Sui n°25 soggetti con lesioni simil tubercolari si è proceduto alla rilevazione delle lesioni ed in particolare della grandezza (A<1cm; B>1cm) e della distribuzione. Di questi, 6 soggetti (24%) presentavano lesioni di tipo A, mentre 19 (76%) lesioni di tipo B. Lesioni generalizzate erano presenti in 14 capi (56%), mentre lesioni localizzate in 9 capi (44%).
La tabella n° 1 riassume i dati relativi a distribuzione e dimensioni delle lesioni.
Sugli stessi soggetti si è proceduto inoltre a rilevare la tipologia di granuloma tubercolare correlandola con l'età dei soggetti. Istologicamente le lesioni osservate erano ascrivibili a granulomi con centro necrotico-calcificato anche voluminoso circondato da una popolazione mononucleata mista di cellule infiammatorie con prevalenza di macrofagi e cellule epiteliodi. Numerose cellule giganti di Langhans erano quasi costantemente presenti. Linfociti e scarse plasmacellule erano poi visibili perifericamente. Fibroplasia periferica era presente soprattutto nei noduli di vecchia data ove le calcificazioni erano maggiori. N° 22 soggetti (88%) hanno mostrato tubercoli di tipo 2, mentre 1 soggetto (4%) tubercoli di tipo 1 e 2 soggetti (8%) tubercoli di tipo 3. La tabella n° 2 riassume la tipologia di granulomi rilevata in relazione all'età dei soggetti.
E' stato infatti interessante notare che il 76% dei capi con lesioni aveva età inferiore ai 2 anni e solo il 24% superiore ai due anni.
Su un gruppo di 30 suini Neri dei Nebrodi selvatici, sui quali sono stati eseguiti l'esame anatomo-patologico e l'indagine biomolecolare, 11 (36,7%) sono risultati positivi all'esame anatomo-patologico mentre mentre l'indagine biomolecolare ha rilevato 21 soggetti positivi (70%) (Tab. n°3).
All'esame biomolecolare tutti i 21 soggetti esaminati sono risultati positivi per *Mycobacterium bovis*

DISCUSSIONE

Dalle indagini effettuate negli anni 2003-2008 risulta che alla riduzione della prevalenza della tubercolosi nel bovino (3,30%) non si assiste parimenti ad una riduzione nel Suino Nero dei Nebrodi che mostra ancora valori di prevalenza più che doppi (7,21%). Questo dato permette di trarre due interessanti considerazioni: o il piano di eradicazione nel bovino non viene attuato nella maniera ottimale (è infatti già stato dimostrato che il controllo della tubercolosi nel bovino porta alla riduzione della tubercolosi nel suino (McInerney et al. 1995) o il suino Nero dei Nebrodi gioca veramente un ruolo importante nella persistenza e nella diffusione della tubercolosi intraspecie ed interspecie nel parco stesso.
Tale ruolo viene supportato inoltre dai risultati ottenuti nell'indagine al mattatoio condotta nel corso del 2008 da cui, in base alla percentuale di animali con lesioni generalizzate (56%), all'estensione delle lesioni polmonari, all'età degli animali con tubercolosi generalizzata con lesioni di tipo B (76%), è ipotizzabile che il suino Nero dei Nebrodi possa trasmettere la malattia ad altre specie, agendo così come un vero serbatoio.
Si è rilevato inoltre che il 72% dei suini con lesioni generalizzate avevano un'età inferiore ai due anni e che per la loro tipologia di allevamento allo stato brado sono maggiormente responsabili della diffusione della malattia.
Altri dati interessanti sono scaturiti dagli esami di biologia molecolare che hanno rilevato una positività alla tubercolosi significativamente maggiore (70%) rispetto all'esame anatomo-patologico (36,7%). Sempre mediante PCR è emersa la presenza esclusiva del *Mycobacterium bovis* in tutti i campioni esaminati. Da questi dati scaturiscono due importanti considerazioni: innanzitutto la prevalenza reale della tubercolosi suina è probabilmente molto più elevata del 7,21%, dato rilevato nella presente indagine, inoltre il riscontro nel suino Nero esclusivamente di *Mycobacterium bovis* dimostra la stretta connessione tra le due specie animali nell'area nebroidea.
Le uniche informazioni esistenti ed ottenute nel corso di questa ricerca non consentono oggi comunque di definire con certezza se questi animali siano ospiti spillover a fondo cieco (dead-end host), o un "serbatoio", e quindi una specie in grado di trasmettere la malattia ad altre .
A tal fine è opportuno ed indispensabile procedere ad ulteriori studi epidemiologici, patologici, microbiologici e molecolari.
Per quanto concerne le fonti di infezione è evidente che la natura onnivora del suino, lo rende potenziale consumatore, soprattutto nei periodi di magra, di carcasse di animali morti e la tipologia di allevamento caratterizzata dalla promiscuità con altre specie animali presenti nel territorio, soprattutto bovini, siano importanti fattori di rischio.
Dai dati anamnestici risulta che un ulteriore fattore di rischio e fonte di infezione sia inoltre l'utilizzo dei derivati della lavorazione del latte per l'alimentazione.
In riferimento a quanto sopra esposto risultano particolarmente interessanti i dati ottenuti dall'indagine effettuata dal 2004 al 2007 sulla quantificazione del rischio negli animali esposti alla tubercolosi in funzione della tipologia aziendale, che indicano l'allevamento "en plein air " meno rischioso per l'esposizione all'infezione (Di Marco et al., 2007c).

CONCLUSIONI

L'attività condotta in questi anni ha permesso di identificare nel Suino Nero dei Nebrodi una specie importante quale spillover o serbatoio della tubercolosi bovina, elemento fondamentale pertanto nel mantenimento della tubercolosi nell'area nebroidea.

Infatti, nei Paesi dove il controllo della diffusione di *Mycobacterium bovis* è risultato essere difficoltoso, l'identificazione di fonti alternative di infezione in altre specie animali (capre, pecore, e animali selvatici) è stata utile per controllare la malattia.
Pertanto, il controllo della tubercolosi in specie selvatiche e la prevenzione del contatto tra fauna selvatica e allevamenti, devono essere considerate priorità per il controllo della tubercolosi nell'area nebroidea (Parra et al., 2003, 2005; Aranaz et al., 2004; Gortazar et al., 2005; Vicente et al., 2006, 2007). Alla luce di quanto sopra riportato è necessario in via prioritaria conoscere la reale diffusione ed incidenza della tubercolosi su tutto il territorio ed in tutte le specie domestiche e selvatiche presenti. Successivamente è opportuno effettuare un piano di profilassi esteso a tutte le specie animali domestiche e selvatiche in quanto ciascuna di esse può costituire un pericoloso serbatoio di diffusione di micobatteri. Sarebbero necessarie, inoltre, infezioni sperimentali per una migliore comprensione della patologia e della riposta immunitaria nei suidi selvatici infetti da micobatteri, in quanto la maggior parte delle informazioni riportate in letteratura sono state desunte dai reperti rilevati nella fase post-mortem. In via del tutto teorica si potrebbe prendere in considerazione l'uso di vaccini efficaci, preferibilmente un vaccino orale, per il controllo della tubercolosi nei suidi selvatici e nelle altre specie selvatiche che potrebbero fungere da serbatoio anche se questa soluzione potrebbe sollevare problematiche nel riconoscimento degli animali vaccinati ed infetti. La strategia di vaccinazione dovrebbe essere combinata con altre misure di controllo volte a ridurre i fattori di rischio della trasmissione individuale della malattia. L'utilizzo inoltre del suino Nero dei Nebrodi nella produzione di prodotti alimentari presso le popolazioni autoctone "macellazione familiare", è una potenziale fonte d'infezione anche per l'uomo (Parra et al., 2003; Di Marco et al., 2004; Di Marco et al., 2005). In questo contesto pertanto, anche l'uomo costituisce un anello importante della catena diffusiva, sia come elemento recettivo, sia come diffusore. Non va inoltre dimenticato che, ad oggi, la continua attuazione dei piani di eradicazione sta provocando una drastica riduzione delle aziende ad attività zootecnica e dunque della fauna locale in particolare nelle zone marginali, inclusa l'area nebroidea. Concludendo auspichiamo un cambiamento radicale dell'attuale gestione sanitaria di un territorio idilliaco e bucolico quale il Parco dei Nebrodi, che sia capace di mantenere e valorizzare un sistema zootecnico espressione della tradizione italiana per la produzione di prodotti tipici di *eccellenza* capaci di creare "sensazioni", esaudire "desideri" e suscitare "emozioni".

Bibliografia

Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sanchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domınguez, L. (2004). Bovine tuberculosis (Mycobacterium bovis) in wildlife in Spain. J. Clin. Microbiol. 42, 2602–2608.

Bollo, E., Ferroglio, E., Dini, V., Mignone, W., Biolatti, B., Rossi, L. (2000). Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in lymph nodes of wild boar (Sus scrofa) by a target-amplified test system. J. Vet. Med. B 47, 337–342.

Corner, L.A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol. 112, 303–312.

Di Marco V., Capucchio M.T., Iozzia G., Tomaselli A., Polino S., Bazzana I., Calabrò A., Catalano D., Guarda F. (2004). Tubercolosi nel suino nero dei Nebrodi: dati preliminari. Atti XXX Meeting annuale S.I.P.A.S., Salsomaggiore Terme, 25-26 marzo, 391-397

Di Marco V., Capucchio M.T., Russo M., Tomaselli A., Calabrò A., Leopardi E., Spartà G., Reale S. (2005).Ruolo del suino nero dei Nebrodi nella diffusione e persistenza della tubercolosi all'interno di un'area protetta. Atti XXXI Meeting annuale S.I.P.A.S., Mantova, 17-18 marzo, 337-343.

Di Marco V., Fiasconaro M., Russo M., Aronica V., Capucchio M.T., Guarda F. (2006a). Tubercolosi nel suino nero dei nebrodi: esperienze personali. Atti XXXII Meeting annuale S.I.P.A.S, Modena, 23-24 marzo, 329-333.

Di Marco V., Russo M., Tomaselli A., Calabrò A., Leonardi E., Salerno A., Iozzia G., Reale S., Guarda F., Capucchio M. T. (2006b). Diffusione e persistenza della tubercolosi nel suino nero del parco dei Nebrodi (Messina): studio preliminare. Summa, 3, 37-42.

Di Marco V., Russo M., Fiasconaro M., Aronica V., Reale S., Capucchio M.T., Caracappa S. (2007c). Bovine tuberculosis in the Nebrodi's black pig: how to assess the risk. 6th International Symposium on the Mediterranean Pig, Capo d'Orlando, 11-13 ottobre, Abs. 32

Di Marco V., Marianelli C., Russo M., Aronica V., Capucchio M.T. (2008).Tuberculosis lesions in the Black wild pigs of Nebrodi park in Sicily: evidence of the role of this species as reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex infection. XXVI° Congress of European Society of Veterinary Pathology, Dubrovnik (Croazia), 17-21 settembre, 84.

Dini V., Ferroglio E., Serraino , Mignone W., Sanguinetti V., Bollo E., Rossi L. (2003). Epidemiologia delle micobatteriosi nel cinghiale in Liguria. J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.), 145-153.

Gortazar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernandez-de- Mera, I.G., Gavin, P., Juste, R.A., Martìn, C., Acevedo, P., De La Puente, M., Höfle, U (2005). Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. Vet. Res. 36, 43–52.

Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik, I. (2003). Wild boar (Sus scrofa) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 and 2001. Vet. Med. 48, 51–65.

Marianelli C., Cifano N., Russo M., Aronica V., Pasquali P., Di Marco V. (2008). Preliminary assessment of tuberculosis in free roaming Nero Siciliano pig population. Pro-

ceedings of 4th Med-Vet-Net Annual Scientific Meeting, St Malo (Francia), 11-14 giugno 2008
Martìn-Hernando, M.P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral,M., Garrido, J.M., de la Fuente, J., Gortazar, C. (2007). Lesions associated with Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar. Tuberculosis 87, 360–367.
McInerney J., Small K.J., Caley P. (1995) Prevalence of Mycobacterium bovis infection in feral pigs in the Norther Territory. Aust. Vet. J., 72:448-451.
Mignone W., Poggi M., Pistone G.C., Caramelli M., Bollo E., Biolatti B. (1995). Pathology of wild boar (Sus scrofa) in Liguria, Italy, between 1989 and 1992. IBEX J. M. E., 3, 85-87.
Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R. (1994). The epidemiology of Mycobacterium bovis infections. Vet. Microbiol. 40, 153–177.
Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex. Vet. Microbiol., 127, 1-9.
Nugent G., Whitford J., Young N. (2002).Use of released pigs as sentinels for Mycobacterium bovis. J Wild. Dis., 38, 665-677.
Parra, A., Fernandez-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., Garcìa, A., Alonso, J.M., de Mendoza, M.H., de Mendoza, J.H. (2003). Epidemiology of Mycobacterium bovis infections of pigs and wild boars using a molecular approach. Vet. Microbiol. 97, 123–133.
Parra, A., Larrasa, J., Garcìa, A., Alonso, J.M., de Mendoza, J.H. (2005). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. Vet. Microbiol. 110, 293–300.
Serraino, A., Marchetti, G., Sanguinetti, V., Rossi, M.C., Zanoni, R.C., Catozzi, L., Bandera, A., Dini,W., Mignone,W., Franzetti, F., Gori, A. (1999). Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. J. Clin. Microbiol. 37, 2766–2771.
Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Fernàndez-de-Mera, I.G., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalence of tuberculosis-like lesions in Spain. Vet. Res. 37, 107–119.
Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Fernàndez-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C. (2007). Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south-central Spain. Vet. Res. 38, 451–464.

Tabella 1. Distribuzione e dimensione delle lesioni tubercolari
Table 1. Distribution and dimensions of the lesions

Gruppo	distribuzione della lesione	lesione "A" (<1cm)	Lesione "B" (>1cm)			
			singola regione	due regioni	tutte le regioni	Totali
1	**Solo testa**	3	1			4
2	**Testa e torace**			5		5
3	**Solo Torace**		4			4
4	**Testa e Addome**			1		1
5	**solo addome**	1	2			3
6	**Testa, torace, addome**	2			6	8
7	**Torace e addome**	//	//	//	//	//
Totali		6	7	6	6	25
		24%	28%	24%	24%	
			76%			

Tabella 2. Tipologia di granulomi tubercolari in funzione dell'eta'dei soggetti
Table 2. Granulomas in different age classes

Tipo di granuloma (calcificazione)		Età			Totali
		svezzato 7-14 mesi0	magrone 12-24mesi	Adulto >2 anni	
Tipo 1	1			1	1 (4%)
Non calcificato					
Tipo 2	22	11	6	5	22 (88%)
Leggera calcificazione					
Tipo 3	2		2		2 (8%)
Massiccia calcificazione					
Totali		11 (44%)	8 (32%)	6 (24%)	25

Tabella 3. Correlazione tra i reperti anatomo-patologici e le indagini biomolecolari
Table 3. Correlations between pathological features and molecular investigations

Numero soggetti	Tipologia di esame	Positivi	Negativi
N° 30	Anatomopatologico	11 (36.67 %)	19 (63.33%)
	PCR	21 (70%)	9 (30 %)

Controllo della malattia da Circovirus

Torna il sereno

Boehringer Ingelheim

I PRINCIPI DI ACCREDITAMENTO DELL'ALLEVAMENTO SUINO: APPLICAZIONE DEL MANUALE QUALITA' IN UNA AZIENDA A CICLO CHIUSO.

PRINCIPLES OF ACCREDITATION IN PIG FARMS: IMPLEMENTATION OF A QUALITY SYSTEM IN A "FARROW TO FINISH" HERD.

ROBERTA DONNA
Libero Professionista

Parole chiave: haccp, tracciabilità, GMP.

Key word: haccp, traceability, GMP.

Riassunto: le ultime normative europee in campo di tracciabilità dei prodotti e rispetto dei principi minimi di benessere animale negli allevamenti intensivi, evidenziano il ruolo fondamentale del settore primario nell'ambito di una corretta gestione del rischio. In questo studio si è voluto dimostrare che l'applicazione di queste normative abbia permesso all'allevamento di migliorare le performance senza ostacolare la gestione. Protocolli di questo tipo possono essere usati in ogni situazione quali "Buone Pratiche di Allevamento, consentendo una autovalutazione da parte degli operatori del settore e fornendo una maggiore garanzia di qualità dei prodotti.

Abstract: : the last European rules on food chain traceability and implementation of minimum animal welfare principles in intensive farms underline the fundamental role of risk control in the primary field.
The aim of this study is to demonstrate that the application of these rules helps the farm to improve the performances without hindering the management.
The same proceeders can be implemented in every situation as "Good Management Practice handbook" allowing the farm to be "own checked" by the FCO (Food Chain Operators) giving the food a safer soundness and a higher quality.

INTRODUZIONE

L'Allegato I del Regolamento 852/2004 ha previsto l'obbligo di rintracciabilità dei prodotti fitosanitari, dei medicinali, dei biocidi, degli additivi, dei mangimi che entrano e vengono utilizzati in azienda e le cui movimentazioni vengono annotati su appositi registri. Dice inoltre che: "gli operatori del settore alimentare possono essere assistiti da altre persone, quali i veterinari, gli agronomi e i tecnici agricoli, nella tenuta delle registrazioni." Grazie a questo Regolamento si estende così an-

che alla produzione primaria l'obbligo dell'autocontrollo, ormai indispensabile per garantire la sicurezza alimentare. Riconoscendo però una certa difficoltà nell'attuazione di un piano HACCP stretto, si giudica sufficiente l'implementazione nell'allevamento dei principi delle "Buone Pratiche di Allevamento".

AUTOCONTROLLO: SCRIVERE QUELLO CHE SI FA, FARE QUELLO CHE SI SCRIVE. Questa potrebbe essere una semplificazione eccessiva, anche se efficace, del concetto di autocontrollo. Parte integrante di questo sistema sono le Buone Pratiche di Allevamento che possono essere definite come : *"l'insieme delle norme, consuetudini, prassi operative che consentono di allevare e curare gli animali in condizioni ottimali garantendone, al tempo stesso, il massimo delle prestazioni e la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti di origine animale da essi derivati."* In altre parole le Buone Pratiche di Allevamento consistono in una serie di comportamenti virtuosi, derivanti da conoscenze specifiche che, se applicate da tutti gli operatori del settore favoriscono la produzione di alimenti sicuri.

Adottare un Manuale di Buone Pratiche di Allevamento è diventato necessario per diversi motivi:

- E' previsto dai regolamenti comunitari,in particolare dal sistema della cosiddetta PAC condizionata.
- Garantisce la copliance delle operazioni in allevamento.
- Offre all'allevatore uno strumento per migliorare le proprie condizioni di allevamento, riconoscendo rischi e pericoli e sapendo come affrontarli per garantire sanità e benessere degli animali, oltre che salubrità dei prodotti ottenuti.

La valutazione del benessere animale in allevamento si trasformerà in informazioni accessibili e comprensibili per il consumatore permettendo una chiara caratterizzazione dei prodotti tutelando i consumatori e valorizzando gli allevatori.

MATERIALI E METODI

Il lavoro è stato svolto in un allevamento della bassa bresciana aperto dal 1982. Trattasi di un'azienda a ciclo chiuso con una capacità di 550 scrofe in cui dal 2005 si è fatto la scelta di approvvigionarsi dalla ditta genetica di scrofette GP e rinnovare internamente il parco scrofe. L'azienda è dotata di un proprio mangimificio interno e dispone di tutti quei parametri di biosicurezza sia e livello ambientale che del personale necessari in un allevamento suinicolo moderno. Dall'inizio del 2007, in accordo con il veterinario aziendale, nell'azienda sono stati introdotti ed attuati dei Protocolli di Buone Pratiche. Lo scopo era di perfezionare l'organizzazione aziendale e fornire un supporto disponibile a tutti gli operatori in modo da migliorare il metodo di lavoro ed avere la possibilità un attuare efficace autocontrollo.
Per quanto riguarda le strutture, l'identificazione dell'azienda e il tipo di alimentazione non è stato possibile introdurre modifiche in quanto si tratta di cambiamenti che hanno un peso economico non indifferente e comunque non influiscono sulla corretta applicazione dei Protocolli di Buone Pratiche che si pone come obiettivo il miglioramento delle condizioni aziendali senza stravolgere la struttura aziendale stessa.

Sono state introdotte diverse migliorie in quella che è la routine gestionale utilizzando come principi base per attuare le diverse modifiche quelli di:

- *ridurre l'uso-abuso di medicinali sia a scopo terapeutico che nel controverso scopo profilattico-metafilattico;*
- *favorire il normale comportamento etologico dei suini uniformandosi il piu' possibili alle norme sul benessere animale;*
- *semplificare il lavoro in azienda standardizzando i diversi casi clinici per facilitarne le diagnosi, la terapia e il tipo di intervento.*

PROTOCOLLI GESTIONE REPARTO GESTAZIONE

Dal 2007 sono state introdotte le suddette modifiche nella gestione manageriale della scrofaia:

- controllo annuale del lardo in P2 sia alle scrofette che nelle scrofe;
- identificazione e rintracciabilità scritta sulla scheda di ogni scrofetta del 1° calore effettuato;
- fecondazione omospermica;
- apposizione di cancelli lungo le file di gabbie gestazione per fermare il passaggio del verro;
- ecografia per diagnosi di gravidanza affidata al veterinario aziendale al 21 giorno.

PROTOCOLLI GESTIONE REPARTO SALA PARTO

Dal 2007 sono state introdotte le seguenti modifiche della gestione delle sale parto:

- eliminata la lavanda uterina di routine il giorno dopo il parto;
- eliminata l'inoculazione di antibiotico di routine nel post parto;
- induzione del parto nelle scrofe ritardatarie piu' di 2 giorni la data prevista;
- lattazione allungata a 28 giorni;
- standardizzato il numero di fecondazioni settimanali in base alle gabbie parto in 33.

PROTOCOLLI MANAGERIALI DI SETTORE

Il personale operante nei diversi settori dell'azienda è stato istruito oralmente e gli è stato fornito un supporto cartaceo in cui vengono elencati tutti i compiti che deve svolgere nel corso della giornata lavorativa. Questo promemoria in apparenza banale è risultato essere molto importante nella standardizzazione del lavoro e nella sua semplificazione. Riporto l'esempio del mansionario della gestazione:

a) controllare la distribuzione automatica del cibo, le dosi alle quali viene erogato e fare manutenzione dei dosatori rotti e degli erogatori d'acqua;

b) controllare che tutte le scrofe, sia in gabbia che in box, si alzino e vadano a mangiare, in caso contrario procedere alla visita come sotto descritto;

c) prelievo seme al verro di turno, controllo qualità del seme e preparazione per la fecondazione delle scrofe del mattino;

d) effettuare il giro per il rilevamento dei calori nelle scrofette e scrofe svezzate. Passare con il verro ruffiano fra le gabbie delle scrofe ancora da ecografare e fra i box di quelle già considerate gravide all'ecografia per evidenziare ritorni in ciclo, fuori ciclo e mantenere alto il livello di progesterone delle scrofe gravide;

e) verificare il corretto apporto luminoso soprattutto nei settori di stimolazione;
f) pulizia dei corridoi e delle gabbie dalle deiezioni;
g) nel pomeriggio ridistribuire il cibo controllando che la mangiatoria sia vuota;
h) effettuare il secondo giro di rilevamento dei calori.

GESTIONE DEL FARMACO

Uso e somministrazione dei farmaci vengono fatte secondo le istruzioni impartite dal veterinario aziendale nel rispetto di quanto riportato sul foglietto illustrativo. I trattamenti sono effettuati solo dal responsabile dell'allevamento o da un suo delegato di fiducia debitamente istruito sul tipo di inoculo, le dosi terapeutiche e tutte le conseguenze derivanti da un mancato rispetto dei tempi di sospensione per il commercio della carne.
Politica dell'azienda per quanto riguarda i presidi farmaceutici è di utilizzarli con oculatezza sotto la diretta responsabilità del veterinario aziendale preferendo farmaci, a parità di efficacia, con tempi di sospensione piu' brevi. Oltre all'ottemperanza degli obblighi previsti per legge e sopra citati (tenute registi, armadietto con farmaci…) l'azienda ha deciso di limitare l'uso di presidi farmacologici a pochi e mirati principi attivi per debellare i patogeni presenti in azineda. Nel caso si verifichi una situazione tale da giustificare un trattamento che esuli da quelli previsti dai protocolli terapeutici, il responsabile dell'allevamento, dopo aver consultato il veterinario aziendale, può iniziare una terapia d'urgenza in attesa della visita del veterinario stesso.
Mi sembra doveroso sottolineare che le medicazioni a scopo profilattico-metafilattico, di cui si fa abuso in tutte le fasi nell'allevamento suinicolo, sono una pratica poco corretta e poco trasparente. Inoltre è stato provato direttamente nell'azienda in esame come l'applicazione dei protocolli migliori lo stato di salute dell'allevamento permettendo di diminuire drasticamente l'uso di mangimi medicati con un enorme vantaggio economico nonché di impatto sul consumatore finale.

ESEMPIO DI PROTOCOLLO TERAPEUTICO

Ogni operatore è stato istruito dal veterinario aziendale sull'uso corretto dei farmaci e, verificatone l'apprendimento, è stato fornito di protocolli scritti indicanti le terapie più comuni da effettuare in azienda, sotto la sua diretta responsabilità. Riporto di seguito due esempi:

PROBLEMI NERVOSI IN SVEZZAMENTO

Il responsabile di settore dopo aver osservato i segni clinici caratteristici (pedalage, testa piegata da un lato, movimenti di maneggio, depressione del sensorio) inizia una terapia con Clamoxyl RTU (amoxicillina) per via intramuscolare alla dose di 1ml/ 20Kg di peso vivo per 3 giorni.

SCROFA INAPPETENTE

Nel caso in cui il responsabile di settore noti una certa svogliatezza o inappetenza deve esaminare in modo piu' approfondito il singolo animale per scoprirne la causa. Come prima cosa deve essere misurata la temperatura che deve rientrare nel range fisiologico

dello stato dell'animale. Nel caso si riscontri una temperatura superiore alla norma, ma al di sotto dei 40°C, il soggetto viene trattato con Findol 10% (ketoprofene) (o altro FANS disponibile in azienda) per via intramuscolare nella dose di 3ml/100kg di peso vivo per 3 giorni consecutivi. Nel caso in cui la temperatura superi i 40°C oltre al FANS l'operatore interviene con Cloxalene Plus (ampicillina e dicloxacillina) per via intramuscolare nella dose di 0,5ml/10kg di peso vivo per 3 giorni consecutivi.

RISULTATI

1. miglioramento composizione parco scrofe:	34% scrofe dal 3° al 6° parto 2006 38,2% scrofe dal 3° al 6° parto 2007 45% scrofe dal 3° al 6° parto 2008
2. miglioramento fertilità:	ritorni 18,76% nel 2006 ritorni 14,67% nel 2007 ritorni 13% nel 2008
3. aborti:	5,2% nel 2006 6,5% nel 2007 3,4% nel 2008
4. fertilità:	78,5% nel 2006 81,5% nel 2007 87% nel 2008
5. parti/scrofa/anno:	2,06 nel 2006 2,14 nel 2007 2, 20 nel 2008

6. utilizzo più razionale dei presidi farmacologici
7. diminuzione del costo dei farmaci (le vaccinazioni sono da considerarsi inalterate nei 3 anni) da 39.700 euro nel 2006 a 24.600 euro nel 2007 a …….euro nel 2008.
8. migliore organizzazione aziendale con risparmio di tempo e risorse.

CONCLUSIONI

L'applicazione dei Protocolli di Buone Pratiche ha apportato in azienda diversi miglioramenti dal punto di vista economico e della biosicurezza alimentare che possono essere così riassunti:

- diminuzione del costo dei farmaci pur mantenendo un livello di salute della popolazione animale alto;
- il minore utilizzo dei presidi farmacologici (sia per l'abolizione di diverse medicazioni di massa sia per il piu' razionale utilizzo dei farmaci iniettabili) riscuote sull'opinione pubblica, oltre che sui prodotti derivati dalle carni di questi animali, un approccio piu' favorevole all'allevamento intensivo;
- una migliore organizzazione del lavoro aziendale ed una maggiore presa di responsabilità da parte di tutti gli operatori del settore primario favorisce il circolo virtuoso delle buone pratiche ed evita sprechi di tempo e denaro;
- tutti i punti sopra esposti favoriscono il miglioramento delle performance aziendali a tutti i livelli.

Resta comunque aperto il dibattito, estremamente attuale in ambito suinicolo, sull'abuso dei presisi farmacologici e sulla legalità della medicazione profilattica; vietata per legge ma abbondantemente impiegata in qualsivoglia allevamento intensivo. Con questo lavoro, estremamente pratico, è stato dimostrato come sia possibile, se non eliminare, quantomeno ridurre l'utilizzo delle medicazioni di massa a scopo profilattico-metafilattico senza destabilizzare i fragili equilibri di un allevamento intensivo. Lavorando sulla trasparenza e sulla rintracciabilità dei prodotti è infatti un dovere del settore primario quello di fornire prodotti il piu' salubri possibile, considerando anche il fatto che così facendo diminuiscono le spese per l'acquisto dei presidi farmacologici con maggiore guadagno dell'allevatore.

IDENTIFICAZIONE DI FENOTIPO LINFOCITARIO CITOTOSSICO E PRODUZIONE DI INTERFERONE-γ MEDIANTE MARCATURA INTRACELLUARE NEL SUINO

I*DENTIFICATION OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTE PHENOTYPE AND INTERFERON-γ PRODUCTION BY INTRACELLULAR STAINING IN SWINE*

LUCA FERRARI, ELENA DE ANGELIS, PAOLO MARTELLI, PAOLO BORGHETTI.

Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.

Parole Chiave: marcatura intracellulare, interferone-gamma (IFNγ), citotossicità, linfociti.

Key Words: intracellular staining, interferon-gamma (IFNγ), cytotoxicity, lymphocytes.

Riassunto. Scopo del presente studio è stato l'ottimizzazione della tecnica di marcatura intracellulare di IFNγ associata alla marcatura di antigeni di superficie (CD8α, CD8β, TCRγ/δ, CD16) per l'identificazione di cellule ad attività citotossica innata e specifica mediante citofluorimetria a flusso a seguito di stimolazione policlonale (aspecifica) con PMA/Ionomicina e monoclonale (virus-specifica) con antigene vaccinale di Aujeszky's Disease Virus (ADV). L'ottimizzazione delle fasi della metodica, ossia attivazione *in vitro*, marcatura di superficie e fissazione, permeabilizzazione e marcatura intracellulare di IFNγ, hanno permesso l'identificazione di cellule producenti IFNγ per tutti gli antigeni citotossici indagati e la quantificazione delle cellule responsive in animali di differente età. Inoltre, sono state identificate e quantificate le cellule responsive ad ADV a differenti tempi dalla 1a e 2a vaccinazione.
Le condizioni sperimentali ed i risultati ottenuti possono quindi sostenere l'utilizzo di tale metodica in associazione con altre tecniche immunologiche sensibili e specifiche quali il saggio ELISpot per determinare lo stato di reattività del sistema immunitario di animali soggetti a protocolli di vaccinazione o per monitorare la risposta immunitaria a seguito di infezioni in cui quella cellulo-mediata risulta fondamentale per favorire l'eliminazione del patogeno.

Abstract. Aim of the present study was the optimization of intracellular staining of IFNγ associated with staining of surface antigens (CD8α, CD8β, TCRγ/δ, CD16) for identification of innate and acquired cytotoxic immune cells by using flow cytometry following polyclonal PMA-ionomycin (non-specific) and monoclonal Aujeszky's Disease Virus (ADV)-specific (vaccine *Porcilis® Begonia*) stimulation. The optimization of *in vitro* activation, surface staining and fixation, permeabilization and IFNγ intracellular staining allowed the identification of IFNγ producing cells for all the cytotoxic cell subsets investigated and the quantification of responsive cells in pigs of different age. Furthermore, ADV-specific responsive cells were detected and quantified after the 1st and 2nd vaccination.

On the basis of the experimental conditions and results obtained, intracellular staining of IFNγ can be used together with other immunological techniques characterized by high sensibility and specificity such as the ELISpot assay to determine the reactivity status of the immune system in vaccinated animals or to monitor the immune response following infections where the cell-mediated response is fundamental to trigger viral clearance.

INTRODUZIONE

La possibilità di ottenere informazioni sempre più specifiche sulla reattività del sistema immunitario ha portato allo sviluppo di tecniche per l'identificazione simultanea di molteplici parametri cellulari. L'analisi mediante citofluorimetria a flusso è stata quindi sfruttata sempre più per identificare specifiche sottopopolazioni immunitarie, oltre che per l'espressione di caratteristici antigeni di superficie, anche per la capacità di secernere mediatori della risposta immunitaria quali citochine. In particolare, la risposta delle cellule immunitarie circolanti nel sangue può fornire un quadro di come l'organismo animale stia reagendo a un determinato antigene, sia esso di natura policlonale (es. mitogeni, tossine) o monoclonale (proteine virali, virus, vaccini); nel suino, cellule ad attività citotossica come le cellule Natural Killer (NK), i linfociti T citotossici CD8+ (LTC), i linfociti T γ/δ (LTγ/δ) e le cellule memoria (CD4+CD8+) sono le principali sottopopolazioni responsabili della produzione di interferone-gamma (IFNγ) oltre che altre citochine. Per questo, la marcatura intracellulare di IFNγ, associata alla rivelazione mediante citofluorimetria a flusso di marcatori di superficie che identifichino tali sottopopolazioni, può essere sfruttata per la caratterizzazione della cinetica e del profilo di espressione di IFNγ da parte di cellule del sistema immunitario all'interno di una popolazione cellulare eterogenea (Prussin et al., 1995) e per la caratterizzazione funzionale di tali popolazioni linfocitarie in specifiche malattie (Jung et al., 1993). Lo studio dei meccanismi d'azione delle cellule ad attività citotossica innata e specifica che partecipano alle difese immunitarie dell'organismo può essere approfondito mediante la rivelazione di citochine intracellulari quali IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 e IFNγ e TNFα (Sipos et al., 2005).
La valutazione della reattività cellulare *in vitro* caratterizzata dalla produzione di IFNγ può essere ricondotta sia ad una risposta ad antigeni che inducono una risposta policlonale o aspecifica, quali PHA, PMA e ionomicina, PWM, oppure ad antigeni che inducono una risposta monoclonale, derivante dalla "memorizzazione" *in vivo* di specifici determinanti antigenici; in quest'ultima categoria di antigeni ricadono proteine virali o strutture virali intere con le quali l'animale può venire a contatto *in vivo*. La caratterizzazione e quantificazione di cellule a fenotipo citotossico producenti IFNγ nella specie suina può rivestire un ruolo importante nel seguire la maturazione del sistema immunitario, la reazione ad una vaccinazione, o determinare come il sistema immunitario del suino stia reagendo ad uno stato di infezione. La tecnica di marcatura intracellulare può essere inoltre accoppiata alla tecnica ELISpot, contraddistinta da una sensibilità a livello di singola cellula, in modo da permettere l'identificazione fenotipica delle frazioni cellulari coinvolte nella produzione di IFN-γ e la comprensione di come le cellule si attivino (Lopez

Fuertes et al., 1999; Diaz et al., 2005). Nonostante le importanti informazioni ottenibili, ancora limitate sono le applicazioni in campo veterinario relativamente a tale tecnica sia nel suino (Rodriguez-Carreño et al., 2002; Charerntantanakul et al., 2005; Suradhat et al., 2005), che in altre specie domestiche quali il bovino (Walravens et al., 2002) e il cavallo (Paillot et al., 2004). Data l'importanza della risposta Th1 mediata e sostenuta dall'IFNγ ricercata mediante vaccinazione per patogeni virali quali Aujeszky's Disease Virus (ADV), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Porcine Circovirus type 2 (PCV2) e le patologie ad essi associate, lo sviluppo e l'applicazione di questa metodica può fornire informazioni fondamentali al fine di progettare vaccini che possano stimolare in modo ottimale l'immunità cellulo-mediata oltre che umorale per una protezione maggiore dell'animale.

MATERIALI & METODI

Campioni

I campioni di sangue sono stati prelevati da suini in fase di accrescimento, di età compresa tra 80 e 120 giorni e da suini all'età di macellazione (10 mesi). L'analisi su tali campioni è stata effettuata sia direttamente su sangue intero (100 µl), sia dopo isolamento delle cellule mononucleate periferiche (PBMC) mediante soluzione Histopaque-1077®. Sono state inoltre isolate PBMC derivanti da sangue di suini vaccinati contro la Malattia di Aujeszky da 4 settimane (88 giorni) e dopo 1 (95 giorni) e 2 (102 giorni) settimane dalla seconda vaccinazione mediante vaccino attenuato gE-/TK- (*Porcilis® Begonia - Intervet*). In entrambi i casi sono stati condotti esperimenti sia su cellule isolate che su cellule dopo scongelamento (-80°C).

Marcatura di superficie e di IFNγ intracellulare

PBMC di suino (5*105 – 1*106) sono state sottoposte a trattamenti differenti di incubazione (4, 20, 48 ore) e stimolazione *in vitro* (4, 20 ore) con PMA (5, 25, 50 ng/ml) e Ionomicina (1 µM) oppure con vaccino vivo attenuato (ADV gE-/TK-) *Porcilis® Begonia* (24, 48 ore; 0.5 MOI), in presenza di Brefeldina-A (BFA, 10 µg/ml). Alla fine del periodo di stimolazione, le cellule sono state sottoposte a marcatura di superficie per 15 min. con anticorpi anti-CD8α-FITC (76-2-11 - Southern Biotech), anti-CD8β (BPG164A - VMRD) + anti-IgG_{2a} (M32201 - Caltag Labs), anti-TCRγ/δ (PGBL22A - VMRD) + anti-IgG_1 (M32001 - Caltag Labs) e anti-CD16-FITC (G7 - Serotec), fissate (15 min.) e permeabilizzate (20 min.) con soluzioni Fix&Perm® (Caltag Labs) o PFA 4% + Saponina 0.1%. Durante la fase di permeabilizzazione le PBMC sono state marcate a livello intracellulare con anticorpo anti-IFNγ-PE (P2G10 - BD Pharmingen) per 15 min. e quindi analizzate mediante citofluorimetro Epics® XL-MCL (Beckman-Coulter).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante Test t di Student e Test di Student a dati appaiati ed espressi come media ± deviazione standard dalla media (significatività per $p<0.05$).

RISULTATI

L'utilizzo di PBMC isolate da campioni di sangue derivanti da suini in accrescimento (80-120 giorni) e di 10 mesi ha permesso di evidenziare, in generale, maggiori percentuali di cellule IFNγ+ totali e ad alta espressione (IFNγ+^{high}) rispetto alle analisi condotte su sangue intero. Inoltre non sono state riscontrate differenze significative nei parametri fisici cellulari e di fluorescenza tra campioni processati direttamente e dopo scongelamento (la cui vitalità è stata confermata almeno pari al 99% mediante *Trypan Blue*).
La stimolazione effettuata per 4 ore ha permesso di evidenziare cellule IFNγ+ esprimenti CD8α, CD8β, TCRγ/δ e CD16. Trattamenti più prolungati (24 – 48 ore) hanno inibito l'espressione di CD16, ma hanno permesso di identificare maggiori frazioni di cellule IFNγ+ positive per gli altri antigeni di superficie indagati e non hanno indotto citotossicità o inibizione dell'attività metabolica.
Si è osservato come la quasi totalità di cellule IFNγ+ siano CD8α+ mentre siano identificabili frazioni variabili di cellule sia negative che positive per gli altri antigeni indagati (CD8β, TCRγ/δ e CD16) producenti IFNγ (Fig.1).

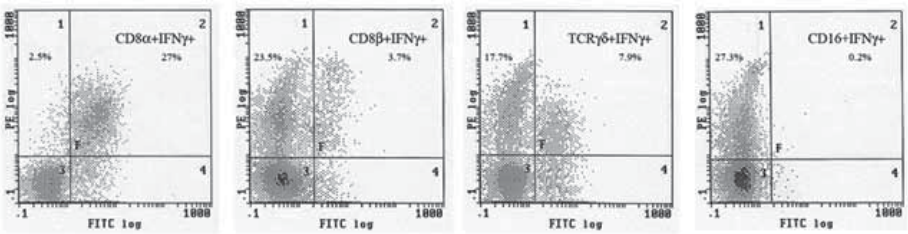


Fig.1: Confronto dell'espressione degli antigeni di superficie CD8α, CD8β, TCRγ/δ e CD16 (FITC) e della produzione di IFNγ (PE) in PBMC di suino a seguito di stimolazione policlonale con PMA e ionomicina.

Fig.1: Comparison of expression of surface antigens CD8α, CD8β, TCRγ/δ e CD16 (FITC) and IFNγ production (PE) in swine PBMC after polyclonal stimulation with PMA and ionomycin.

Per quanto riguarda i trattamenti di fissazione e permeabilizzazione, l'utilizzo delle soluzioni del kit commerciale Fix&Perm® ha permesso la rivelazione di percentuali di cellule IFNγ+ totali più elevate rispetto ai campioni trattati con PFA 4% e Saponina 0.1%.
La fissazione e la permeabilizzazione dei campioni con Fix&Perm® hanno permesso inoltre l'identificazione di una frazione di cellule a bassa espressione (IFNγ+^{low}) ed una frazione ad alta espressione (IFNγ+^{high}) (Fig.2): tale profilo è risultato maggiormente evidente nelle sottopopolazioni CD8α+ e CD8β+ ed in misura inferiore nelle sottopopolazioni TCRγ/δ+ e CD16+.

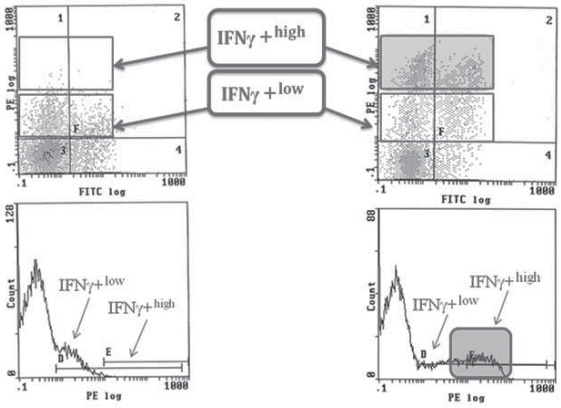


Fig.2: Effetto di differenti soluzioni di fissazione e permeabilizzazione sulla rivelazione di cellule IFNγ+. PBMC di suino fissate (PFA o FIX®) e permeabilizzate (SAP o PERM®) dopo stimolazione con PMA e Ionomicina. PFA: Paraformaldeide 4%; SAP: Saponina 0.1%.

Fig.2: Effect of different fixation and permeabilisation solutions on the detection of IFNγ+ cells. Swine PBMC fixed and permeabilized after stimulation with PMA and ionomycin. PFA: paraformaldehyde 4%; SAP: saponin 0.1%.

Per quanto riguarda le modificazioni delle sottopopolazioni IFNγ+ in funzione dell'età degli animali, si è osservato che in suini di età compresa tra 80 e 120 giorni vi è un graduale incremento della percentuale di cellule IFNγ+ totale e IFNγ+^{high}; la percentuale di PBMC producenti IFNγ (cellule IFNγ+ totali) negli animali al macello (10-13 mesi) è risultata notevolmente superiore rispetto agli animali in accrescimento considerati complessivamente ($p<0.05$), così come sono risultate aumentate le frazioni doppio positive CD8β+IFNγ+ e TCRγδ+IFNγ+ ($p<0.05$). Contemporaneamente all'aumento della popolazione totale IFNγ+ (5.00±2.24% vs 20.90±4.84%; $p<0.05$), si è registrato anche un aumento della frazione cellulare IFNγ+^{high} (E, 1.72±2.02% vs 7.28±2.06%; $p<0.05$) (Fig.3).

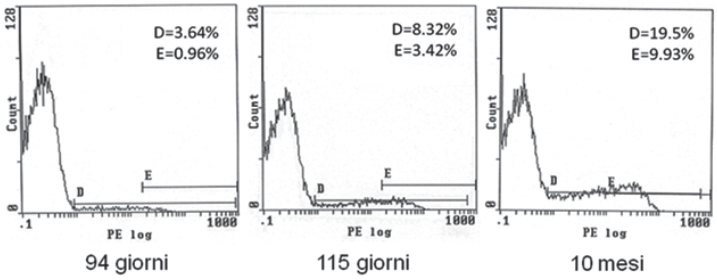


Fig.3: Livelli di cellule IFNγ+ in funzione dell'età. D: cellule IFNγ+ totali; E: cellule IFNγ+ ad alta espressione (IFNγ+^{high}) in un suino rappresentativo.

Fig.3: Levels of IFNγ+ cells at different ages. D: total IFNγ+ cells; E: IFNγ+high cells in one representative pig.

In particolare, utilizzando il kit Fix&Perm®, si è potuto evidenziare un incremento della frazione di cellule CD8β+IFNγ+ dal 1.34±0.39% al 7.56±1.78% e della frazione TCRγδ+IFNγ+ dal 0.49±0.26% al 1.40±0.38%. La frazione CD16+IFNγ+ invece non ha mostrato una modificazione significativa (0.70±0.30% vs 0.44±0.20%), ma si è ridotto il rapporto tra cellule CD16+IFNγ+ e cellule IFNγ+ totali (14.88±6.93% vs 3.60±3.94%; $p<0.05$) (Fig.4).
Stesso andamento, è stato riscontrato per tutte le sottopopolazioni utilizzando PFA e saponina, ad eccezione della rivelazione delle cellule IFNγ+^{high}, non evidenziabili.

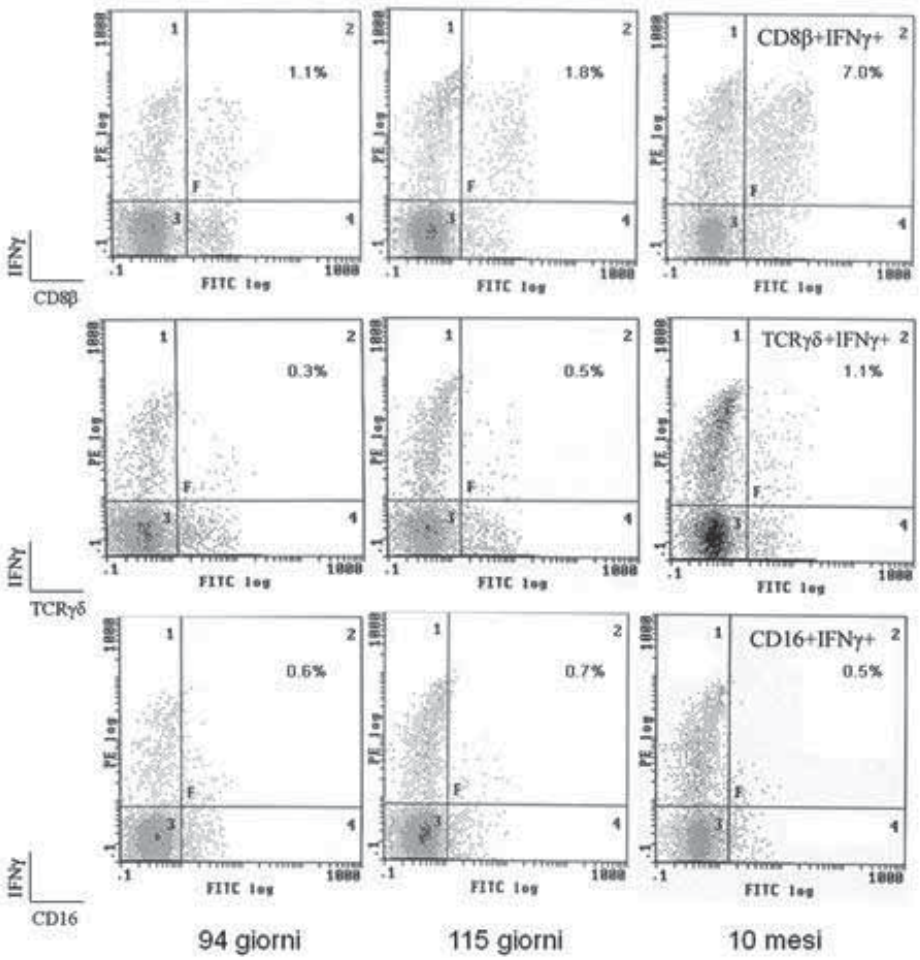


Fig.4: Livelli di cellule CD8β+IFNγ+, TCRγδ+IFNγ+ e CD16+IFNγ+ in funzione dell'età in un suino rappresentativo.

Fig.4: Levels of CD8β+IFNγ+, TCRγδ+IFNγ+ e CD16+IFNγ+ cells at different ages in one representative pig.

La stimolazione *in vitro* mediante PMA e Ionomicina è stata quindi sfruttata come condizione di controllo positivo in campioni di PBMC derivanti da suini vaccinati contro la Malattia di Aujeszky con vaccino vivo attenuato *Porcilis® Begonia*. La stimolazione con un quantità di 0.5 MOI di vaccino per 24 ore ha permesso l'identificazione di cellule CD8α+IFNγ+ ADV-specifiche; inoltre monitorando animali vaccinati a distanza temporale dalla prima (60 giorni) e seconda (88 giorni) vaccinazione, si è potuto evidenziare la comparsa e un successivo incremento della frazione di suddette cellule doppio positive. La frazione di cellule CD8α+ non producenti IFNγ non è apparsa invece sensibilmente influenzata (Fig.5).

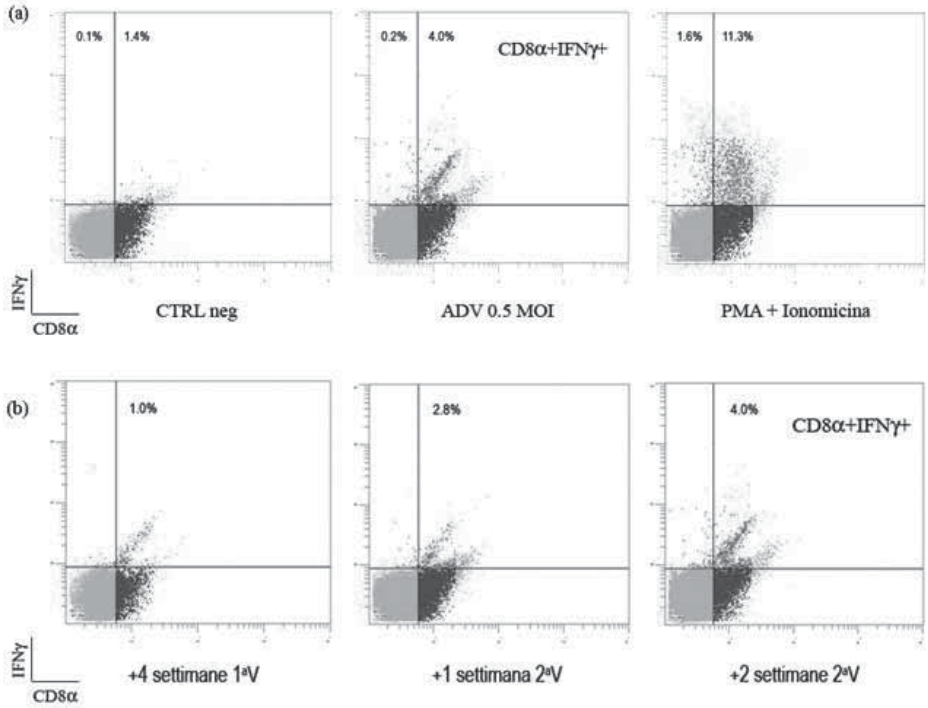


Fig. 5: (a) Quantificazione di cellule ADV-specifiche CD8α+IFNγ+ dopo stimolazione in vitro per 24 ore con vaccino Porcilis® Begonia dopo 2 settimane dalla seconda vaccinazione (mostrate anche le risposte di cellule non stimolate e stimolate con PMA/ionomicina); (b) quantificazione di cellule ADV-specifiche CD8α+IFNγ+ dopo la 1a (60 giorni, 1aV) e 2a (88 giorni, 2aV) vaccinazione.

Fig. 5: (a) Quantization of ADV-specific CD8α+IFNγ+ cells after in vitro stimulation for 24 hrs with Porcilis® Begonia vaccine 2 weeks after the 2nd vaccination (also shown the responses of unstimulated and PMA/ionomycin-stimulated cells); (b) quantization of ADV-specific CD8α+IFNγ+ cells after the 1st (60 days, 1ªV) and 2nd (88 days, 2ªV) vaccination.

La stimolazione con antigene vaccinale di ADV per un periodo di 48 ore ha permesso l'identificazione di cellule producenti IFNγ ma l'intensità del segnale (cellule IFNγ+ e CD8α+IFNγ+) è apparsa sensibilmente ridotta (dato non mostrato).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'IFNγ è una citochina pleiotropica che gioca un ruolo fondamentale nell'infiammazione e nella risposta immunitaria; potenzia l'attività microbicida dei macrofagi e la capacità di processare e presentare antigeni ai linfociti T. Inoltre regola lo *switch* isotipico delle IgG nei linfociti B ed inibisce la proliferazione delle cellule Th2, favorendo l'indirizzamento Th1.
La produzione di IFNγ è coinvolta anche nelle fasi di risposta ad un'infezione primaria in modo da indurre e stimolare una risposta infiammatoria più efficace e sostenere la risposta immunitaria specifica al fine di eliminare il patogeno.
Sebbene la rivelazione della produzione di tale citochina a livello intracellulare e di antigeni di superficie mediante citofluorimetria a flusso è una procedura ampiamente sperimentata in ambito umano, in immunologia suina i protocolli e i dati presenti in letteratura relativi alle applicazioni di questa metodica sono limitati e forniscono risultati variabili e a volte discordanti.
Nel presente studio si sono quindi ottimizzate condizioni per l'identificazione di IFNγ intracellulare e marcatori di citotossicità innata e specifica quali CD8α, CD8β, TCRγδ e CD16.
Le PBMC si sono rivelate il campione più idoneo per l'identificazione delle sottopopolazioni indagate e non soggette a citotossicità da mantenimento *in vitro* o particolarmente sensibili al congelamento/scongelamento.
Tra le marcature testate, la rilevazione della catena α del CD8, per l'identificazione delle cellule doppio positive CD8α+IFNγ+, è apparsa ottimale e contraddistinta da un segnale intenso. La popolazione CD8α+ è infatti costituita da più sottopopolazioni tra le quali cellule a fenotipo citotossico naturale (cellule NK CD3-CD8α+CD16+), parzialmente specifico (linfociti T γδ TCRγδ+CD8α+) e MHC-ristretto (cellule CD4+CD8α+^{low} memoria e linfociti T citotossici CD4-CD8α+^{high}β+). Il CD8 è espresso nei linfociti T come omodimero αα (cellule memoria e cellule NK) o come eterodimero αβ (CTL, linfociti T citotossici). È stato dimostrato che la densità della molecola sulla membrana cellulare consente di distinguere i linfociti T citotossici, CD3+CD16-, dalle cellule NK, CD3-CD16+, essendo i primi ad alta densità di CD8α (CD8α+^{high}) e la seconda popolazione a bassa densità di CD8α (CD8α+^{low}). La sottopopolazione di cellule CD8α comprende inoltre una elevata percentuale di cellule memoria a fenotipo CD4+CD8+ produttrici di IFNγ.
Analogamente la marcatura degli antigeni di superficie CD8β e TCRγδ è risultata agevole, mentre la marcatura dell'antigene CD16, relativa allo stato di attivazione delle cellule NK tra i linfociti, è apparsa fortemente influenzata dal tempo di incubazione e/o stimolazione (4 ore vs 20, 48, 72 ore).
Nelle nostre condizioni, la stimolazione per 4 ore sembra essere il trattamento più adatto per identificare la popolazione di cellule CD16+; per periodi di stimolazione più lunghi, in animali adulti, si verifica generalmente una diminuzione della percentuale di cellule CD16+ mentre in animali giovani il fenomeno non si è manifestato.

I dati presenti in letteratura suggeriscono infatti, che l'antigene può essere esposto per un breve periodo di tempo sulla superficie della cellula dopo attivazione ed internalizzato e/o rilasciato all'esterno della cellula successivamente (Moldovan et al., 1999; Middelhoven et al., 2001).
La stimolazione diretta per 4 ore con PMA e Ionomicina in presenza di Brefeldina A è risultata una condizione più adatta nei campioni di animali di 10 mesi in quanto animali più giovani, in cui le sottopopolazioni IFNγ+ sono meno rappresentate, forniscono un segnale più intenso con una stimolazione più prolungata.
Anche nelle nostre condizioni l'utilizzo delle soluzioni commerciali Fix&Perm®, rispetto alla combinazione di PFA e saponina, ha permesso di ottenere i risultati migliori relativamente alla frazione cellulare IFNγ+, sia sotto il profilo qualitativo che quantitativo come sostenuto in letteratura (Zelnickova et al., 2007; Gerner et al., 2008).
Le analisi su PBMC di suino hanno mostrato differenze nella percentuale di cellule IFNγ+ tra animali in accrescimento e animali di 10 mesi, con maggiori valori a favore di quest'ultimi. Tale dato è in linea con risultati ottenuti da Rodriguez-Carreño e coll. (2002) riportanti percentuali del 34.2±5.7% di cellule IFNγ+ in suini di 3 anni rispetto al 13.2±5.8% in animali di 6 mesi.
L'aumento registrato in funzione dell'età ha interessato in particolare le sottopopolazioni doppio positive CD8β+IFNγ+ e TCRγδ+IFNγ+. Il cambiamento della percentuale di cellule che producono IFNγ in dipendenza dell'età dell'animale riflette un cambiamento qualitativo e quantitativo delle frazioni contenute nelle PBMC e dell'intero sistema immunitario. Esso infatti acquisisce nel tempo una sempre maggior competenza dovuta all'aumento in particolare di cellule effettrici citotossiche (CD8β+IFNγ+) che potrebbero appartenere a una popolazione memoria. Infatti, l'aumento della percentuale totale di cellule IFNγ+ osservato può essere ragionevolmente ricondotto ad un aumento della popolazione di cellule memoria CD4+CD8+ [alte produttrici di IFNγ se stimolate (Zuckermann et al., 1999)], linfociti T citotossici (CTL) e in minor misura, linfociti T helper 1, linfociti T γδ e cellule NK.
La stimolazione per 24 ore con ADV ha permesso di evidenziare cellule a fenotipo CD8α+IFNγ+ ADV-specifiche. Un'incubazione più prolungata ha indotto un abbassamento del segnale ragionevolmente riconducibile a un possibile effetto citopatico del virus. Le percentuali di cellule ADV-specifiche produttrici di IFNγ osservate sono paragonabili a quelle osservate a seguito di stimolazione con virus erpetico analogo nella specie equina (EHV-1; Paillot et al., 2005) e sottolineano una specifica e più ristretta attivazione monoclonale.
L'associazione della metodica di marcatura intracellulare con la determinazione delle cellule secernenti IFNγ mediante tecnica ELISpot potrà consentire una identificazione ottimale del fenotipo delle cellule responsive nella valutazione dell'efficienza della risposta immunitaria sia in condizioni di infezione che di vaccinazione. Si segnala inoltre che tale metodica, nel presente lavoro ottimizzata utilizzando ADV, può essere estesa, con le finalità sopra indicate, allo studio della risposta immunitario in corso di altre infezione del suino.

Bibliografia

1. Charerntantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J.A. (2006) Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Vet. Immunol. Immunopathol., 109, 99-115.

2. Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E. (2005) Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of PRRSV. J. Gen. Virol., 86, 1943-1951.

3. Gerner W., Käser T., Pintaric M., Groiss S., Saalmüller A. (2008) Detection of intracellular antigens in porcine PBMC by flow cytometry: a comparison of fixation and permeabilisation reagents. Vet. Immunol. Immunopathol. 121, 251-259.

4. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Methods, 159, 197-207.

5. Lopez Fuertes L., Doménech N., Alvarez B., Ezquerra A., Domínguez J., Castro J.M., Alonso F. (1999) Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection, Virus Res., 64, 39-41.

6. Middelhoven P.J., Van Buul J.D., Hordijk P.L., Roos D. (2001) Different proteolytic mechanisms involved in FcgRIIIb shedding from human neutrophils, Clin. Exp. Immunol., 125, 169-175.

7 Moldovan I., Galon J., Maridonneau-Parini I., Roman Roman S., Mathiot C., Fridman W.H., Sautès-Fridman C. (1999) Regulation of production of soluble Fcγ receptors type III in normal and pathological conditions. Immunol. Lett., 68, 125-132.

8. Paillot R., Daly J.M., Juillard V., Minke J.M., Hannant D., Kydd J.H. (2005) Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. 23, 4531-4543.

9. Prussin C. e Metcalfe D.D. (1995) Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J. Immunol. Methods, 188, 117-120.

10. Rodriguez-Carreño M.P., López-Fuertes L., Revilla C., Ezquerra A., Alonso F., Domínguez J. (2002) Phenotypic characterization of porcine IFN-γ-producing lymphocytes by flow cytometry. J. Immunol. Methods, 259, 171-179.

11. Sipos W., Willheim M., Hofbauer G., Pietschmann P. (2005) Evaluation of the suitability of monoclonal antibodies for flow cytometric intracellular cytokine detection in porcine peripheral blood lymphocytes. J. Vet. Med. 52: 55-60.

12. Suradhat S., Sada W., Buranapraditkun S., Damrongwatanapokin S. (2005) The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulation following exposure to classical swine fever virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 106: 197-208.

13. Walravens K., Wellemans V., Weynants V., Boelaert F., deBergeyck V., Letesson J.J., Huygen K., Godfroid J. (2002) Analysis of the antigen-specific IFN-γ producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. Vet. Immunol. Immunopathol., 84: 29-41.

14. Zelnickova P., Faldyna M., Stepanova H., Ondracek J., Kovaru F. (2007) Intracellular cytokine detection by flow cytometry in pigs: fixation, permeabilization and cell surface staining. J. Immunol. Methods, 327, 18-29.

15. Zuckermann F.A. e Husmann R.J. (1996) Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T-cells. Immunol., 87, 500-512.

UTILIZZO DI UN TEST DI CAMPO PER LA RICERCA DI *LAWSONIA INTRACELLULARIS* DA FECI SUINE. RISULTATI PRELIMINARI.

USE OF A FIELD TEST FOR THE DETECTION OF LAWSONIA INTRACELLULARIS IN SWINE FECES. PRELIMINARY RESULTS.

PAOLO FERRO

Elanco AH div. di Eli Lilly Italia – Sesto Fiorentino – FI.

Parole chiave: *Lawsonia intracellulari*s, ileite subclinica, *Lawsonia* first test™.

Key words: *Lawsonia intracellularis*, subclinical ileitis, *Lawsonia* first test™.

Riassunto. *Lawsonia intracellularis* (*L.i.*), batterio intestinale molto diffuso in tutto il mondo, causa una malattia chiamata ileite, che si manifesta soprattutto nelle forme cronica o sublinica nelle fasi di magronaggio-ingrasso. Nel presente studio si riportano i risultati preliminari relativi all'utilizzo di un test di campo (*Lawsonia* first test™) per la ricerca di *L.i.* dalle feci suine. Si intendeva stabilire la modalità di eliminazione in corso di infezione da *L.i.*. Vengono riportati i risultati relativi all'esecuzione del test in nr. 42 allevamenti. Secondo il protocollo di utilizzo del test sono stati analizzati due gruppi di animali (10 campioni di feci per gruppo) per allevamento selezionati in funzione dell'età (gruppo 1: 8-14 settimane, gruppo 2: 16-24 settimane), con registrazione di sintomatologia riferibile ad ileite cronica dove presente e identificazione dei gruppi che stavano presumibilmente eliminando *L.i.*. Dai risultati ottenuti la percentuale dei gruppi che stavano eliminando *L.i.* è risultata essere molto elevata (81% e 88% rispettivamente per i gruppi 1 e 2), anche in quelle realtà in cui in nessuno dei due gruppi analizzati era presente sintomatologia clinica riferibile a ileite cronica (75% e 100% rispettivamente per i gruppi 1 e 2).

Abstract. The infection by *Lawsonia* intracellularis (*L.i.*) causes ileitis, one of the most common enteric disease all around the world, that is more frequent in its chronic or sub-clinical forms in the growing – fattening phase. This study shows the preliminary results about the use of a field test *(Lawsonia* first test™) for the detection of L.i. in swine feces. The objective was to define the shedding of L.i. in infected groups of pigs. There are the results about 42 tested farms. According to the instructions of the test were tested 2 groups of animals (10 fecal samples per group) per farm on the basis of the age (group 1: 8-14 weeks; group 2: 16-24 weeks). Were also recorded the clinical signs of chronic ileitis and were identified the groups that probably were shedding *L.i.*. The results show very high percentages of groups that were shedding *L.i.* (81% and 88% respectively for groups 1 and 2) also in the farms where there weren't clinical signs of chronic ileitis (75% and 100% respectively for groups 1 and 2).

INTRODUZIONE

Lawsonia intracellularis (*L.i.*), batterio intestinale a diffusione cosmopolita, è responsabile di ileite nel suino. La patologia si manifesta solitamente nelle fasi di magronaggio-ingrasso, in forma cronica, ed è caratterizzata da diarrea grigio-verdastra, con presenza di materiale indigerito. E' frequente il riscontro della forma subclinica che porta ad una

diminuzione delle *performances* produttive, con un sensibile aumento delle variazioni di peso tra i soggetti colpiti. In suini macellati a 110 kg le possibili perdite provocate da quest'ultima forma sono state stimate in una riduzione del 30% negli accrescimenti medi giornalieri ed in un aumento del 23% negli indici di conversione(1). Studi precedenti hanno dimostrato la presenza di L.i. nel 97% degli allevamenti europei(2).

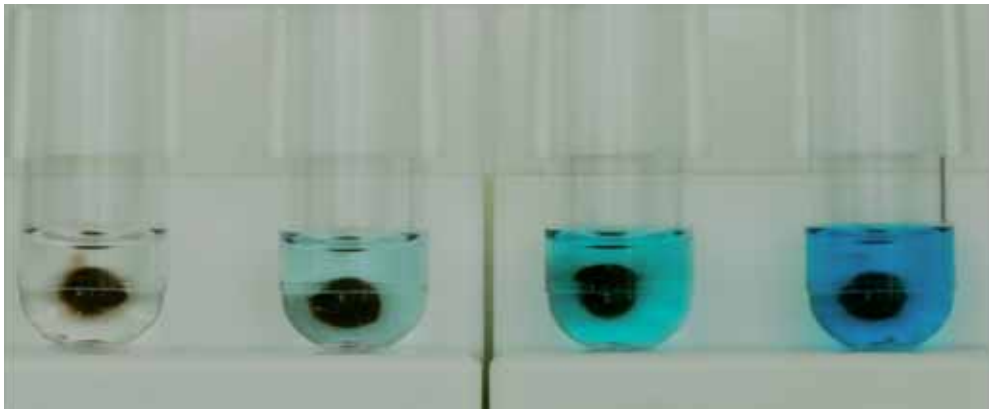
OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nel presente studio vengono riportati i risultati preliminari relativi all'utilizzo di *Lawsonia* first test™ (Microcoat Biotecnologie, GmbH), test di campo specifico per la ricerca di *L.i.* in campioni fecali di suino. Avvalendosi del supporto dato da indicazioni manageriali e dalla valutazione della sintomatologia si intende stabilire la modalità di eliminazione in corso di infezione da Li. nei settori di magronaggio – ingrasso.

MATERIALI E METODI

Lawsonia first test™, test qualitativo monouso, costruito su tecnica ELISA, richiede due ore di tempo per l'esecuzione e, con l'ausilio di biglie magnetiche, permette l'identificazione di *L.i.* nelle feci. Gli anticorpi policlonali diretti contro l'antigene *L.i.* (*Lawsonia-p*Ab), vengono legati da un lato alle biglie utilizzate per la preliminare fase di cattura (fase 1) e dall'altro all'enzima perossidasi (POD), utilizzato per la successiva fase di rilevazione del complesso Ag-Ab (fase 2). Al complesso viene infine aggiunto un sistema rivelatore, in modo da ottenere una variazione cromatica visibile. Un risultato positivo per L.i. viene segnalato da un viraggio di colore blu della soluzione, mentre il risultato negativo viene indicato da una soluzione incolore (fig.1).

Fig. 1. Interpretazione dei risultati.
Fig. 1. Interpretation of the results.



Studi sperimentali sono stati condotti per comparare risultati ottenuti dagli stessi animali applicando *Lawsonia* First test™ e la tecnica ELISA. Dai risultati appare che *Lawsonia* First test risulta negativo in animali ELISA negativi e positivo in quelli Elisa positivi. Tale dato suggerisce che i test sono concordanti(3). La prova sperimentale è stata condotta nel periodo settembre-novembre 2008 in nr. 42 allevamenti suini, individuati nel comprensorio zootecnico settentrionale del Paese. Il protocollo di utilizzo del test prevedeva l'esame di due gruppi di animali, selezionati in funzione dell'età (gruppo 1: 8-14 settimane, gruppo 2: 16-24 settimane), con il prelievo di nr.10 campioni fecali per gruppo. I campioni fecali venivano raccolti dal terreno in presenza di feci "singole" e "fresche" o, in caso di difficoltà, direttamente dall'ampolla rettale. Nel corso della fase di prelievo si procedeva alla registrazione di possibile riscontro di sintomatologia riferibile ad ileite cronica. Venivano infine classificati come gruppi positivi (gruppi che stavano presumibilmente eliminando *L.i.*) i gruppi in cui c'erano più di 2 campioni positivi a *Lawsonia* first test™ e come gruppi negativi (gruppi che non stavano eliminando *L.i.*) i gruppi in cui i campioni positivi erano ≤ 2(3).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 1 sono riportati i risultati complessivi relativi ai 2 gruppi d'età analizzati nei 42 allevamenti oggetto della prova.

Tabella 1. Risultati generali.
Table 1. General results.

	Gruppo 1 (8-14 settimane)		Gruppo 2 (16-24 settimane)	
Nr. allevamenti	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi
42	34	81%	37	88%

Nelle tabelle 2 e 3 i risultati vengono distinti in base al riscontro o meno di sintomatologia riferibile a ileite cronica.

Tabella 2. Allevamenti con sintomatologia clinica riferibile a ileite cronica in uno o entrambi i gruppi d'età analizzati.
Table 2. Farms with clinical signs of chronic ileitis in one or both the tested groups.

	Gruppo 1 (8-14 settimane)		Gruppo 2 (16-24 settimane)	
Nr. allevamenti	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi
30	25	83%	25	83%

Tabella 3. Allevamenti senza sintomatologia clinica riferibile a ileite cronica in entrambi i gruppi d'età analizzati.
Table 3. Farms without clinical signs of chronic ileitis in both the tested groups.

	Gruppo 1 (8-14 settimane)		Gruppo 2 (16-24 settimane)	
Nr. allevamenti	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi	Nr. gruppi positivi	% gruppi positivi
12	9	75%	12	100%

Dai risultati ottenuti nei 42 allevamenti in cui è stato fatto il test il numero dei gruppi in cui era presumibilmente in atto eliminazione di *L.i.* è risultato essere molto elevato in entrambe le classi d'età analizzate. Globalmente, sono risultati infatti positivi l'81% dei gruppi 1 (8-14 settimane) e l'88% dei gruppi 2 (16-24 settimane). Si ritiene interessante il dato rilevato in particolare nei 12 allevamenti in cui non era stata registrata sintomatologia clinica riferibile a ileite cronica in nessuno dei due gruppi analizzati: in questi infatti la percentuale di gruppi in fase di eliminazione di *L.i.* è risultata essere del 75% nei gruppi 1 e del 100% nei gruppi 2. Questo dato confermerebbe l'elevata diffusione dell'infezione da *L.i.*(2) nel settore magronaggio – ingrasso anche in assenza di sintomatologia. I risultati riportati rappresentano il primo step di uno studio più ampio tutt'ora in corso. I dati verranno infatti implementati dall'esecuzione del test in un numero maggiore di allevamenti e dalla registrazione delle *performances* di accrescimento in gruppi di suini positivi al test in cui non sia riscontrata sintomatologia clinica riferibile a ileite cronica.

Bibliografia

(1) Veenhuizen MF et al. (1998) "The potential economic impact of porcine proliferative enteropathy on the US swine industry" in: "Proceedings of the 15th IPVS Congress", Birmingham, England, 5-9 July 1998, 64.

(2) Hardge T et al. (2006) "Serological prevalence of *Lawsonia intracellularis* across European pig herds" in: "Proceedings of the 19th IPVS Congress", Copenhagen, Denmark , 16-19 July 2006, 77.

(3) Green L (2008) "A summary of cross sectional study investigating the Lawsonia First test™" – Elanco data on file.

UN EPISODIO DI VAIOLO DEL SUINO: RILIEVI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI

SWINEPOX OUTBREAK: PATHOLOGICAL FINDINGS

SERGIO FRANGIONE[1], GIOVANNI DI TEODORO[2], DANIELE FASCIANELLA[2], RICCARDO DE MARZI[2], GIUSEPPE MARRUCHELLA[2]

[1] ***Medico Veterinario Libero Professionista, Vasto (Chieti);***
[2]***Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza Aldo Moro 45 – 64100 – Teramo.***

Parole Chiave: cute, vaiolo del suino, lesioni macroscopiche, lesioni microscopiche, diagnosi.

Key Words: *skin, swinepox, gross lesions, histopathology, diagnosis.*

Riassunto. Il vaiolo suino è una malattia infettiva e contagiosa ad eziologia virale, a decorso solitamente benigno, caratterizzata dalla comparsa di tipiche lesioni cutanee esantematiche e sostenuta da *Swine Poxvirus* (SPoV). Vengono descritte le lesioni cutanee osservate in un episodio di vaiolo suino verificatosi in un piccolo allevamento rurale. Il problema si è reso evidente verso la fine della stagione estiva ed ha coinvolto la quasi totalità dei suinetti svezzati. Le lesioni erano prevalentemente localizzate sul piatto delle cosce e sulla superficie interna del padiglione auricolare. L'esperienza qui riportata supporta l'ipotesi che l'infezione sostenuta da SPoV sia piuttosto diffusa, soprattutto in alcune realtà produttive "marginali". Il ricorso razionale alle indagini istopatologiche si dimostra uno strumento valido, rapido ed economicamente vantaggioso per la risoluzione del quesito diagnostico.

Summary. *Swinepox is a contagious, generalizing virus infection affecting pigs and caused by Swine Poxvirus (SPoV). It is associated with a typical exanthema of the skin on the whole body. The Authors herein describe the SPoV-induced skin lesions observed in a familial-type swine herd. Swinepox affected almost all weaned piglets in late summer. Lesions mainly occurred on the ears, as well as on the inner aspects of lower limbs. The present report suggest that SPoV-infection is probably more common than generally believed and highlights the usefulness of histopathology as an efficient, cheap and fast diagnostic tool.*

INTRODUZIONE

La cute del suino svolge molteplici funzioni e, nel contempo, rappresenta uno specchio fedele in cui si riflette la salute dell'organismo (1). Le lesioni e le malattie cutanee sono estremamente frequenti nella specie suina, riconoscendo un'eziopatogenesi complessa e diversificata: agenti biologici (virus, batteri, miceti e parassiti), turbe metaboliche di origine dietetica, stati tossico-infettivi generalizzati, traumatismi di varia natura, disturbi

comportamentali etc. Pertanto, le lesioni della pelle possono essere espressione sia di patologie esclusivamente cutanee sia di stati morbosi a carattere sistemico (1, 4, 5).
Vengono di seguito riportati i quadri lesivi osservati nell'ambito di un focolaio di vaiolo della specie suina, rimarcando gli aspetti macroscopici e microscopici di maggior rilievo ed utilità ai fini diagnostici differenziali.

MATERIALI E METODI

L'allevamento in questione è a ciclo chiuso ed ospita circa 30 riproduttori, la metà dei quali ha cute pigmentata e caratteristiche morfologiche riconducibili al Suino Nero del Sub-Appennino Dauno. Tale razza, anticamente associata alla transumanza e pressoché totalmente scomparsa dai territori di origine (Abruzzo meridionale, Molise, Daunia campana, Gargano), resiste tuttavia in piccoli nuclei e viene utilizzata ancora oggi per la produzione di salumi tipici. Le scrofe vengono confinate esclusivamente al momento del parto e durante l'allattamento dei lattonzoli, che si protrae mediamente per 45 giorni. La sala parto contiene una dozzina di box con lettiera in paglia. Tutte le restanti fasi del ciclo produttivo si compiono all'aperto, compresa la monta naturale.
Nel periodo tardo-estivo, la quasi totalità dei suinetti svezzati mostra lesioni cutanee, più o meno numerose e prevalentemente localizzate sul piatto delle cosce e sulla superficie interna del padiglione auricolare. Le lesioni non sembrano coinvolgere i soggetti più adulti e colpiscono indifferentemente suinetti a cute chiara e pigmentata.
Macroscopicamente, le lesioni hanno aspetto circolare, margini netti e diametro compreso fra 0.5-1.5 cm. Nel loro contesto, si possono individuare un'ampia porzione centrale di colore scuro ed aspetto crostoso e una zona periferica iperemica, leggermente rilevata rispetto al tessuto circostante (Fig. 1a).
Da tre suinetti, deceduti spontaneamente, vengono prelevati e fissati in formalina alcuni campioni di cute. Tali campioni vengono quindi processati come di *routine* per le successive indagini microscopiche; a tal fine, sezioni tessutali di 5 micron di spessore vengono colorate con ematossilina-eosina e secondo la metodica di *Gram*.

RISULTATI

All'osservazione microscopica, in corrispondenza dei margini lesivi si nota l'ispessimento dell'epidermide che coinvolge sia lo strato spinoso (acantosi) sia lo strato corneo (ipercheratosi e paracheratosi). Di particolare interesse le modificazioni a carico dei cheratinociti dello strato spinoso, i quali appaiono focalmente in preda a degenerazione palloniforme, con nucleo d'aspetto vescicoloso a seguito della marginazione della cromatina. Inoltre, nel citoplasma delle suddette cellule è possibile osservare la presenza di caratteristiche inclusioni eosinofiliche (Fig. 1b). Di comune riscontro risultano, inoltre, l'edema intercellulare e la presenza di granulociti neutrofili che migrano nello spessore dell'epidermide ("exocitosi"). Quadri lesivi analoghi coinvolgono anche alcuni follicoli piliferi.
In corrispondenza delle porzioni centrali delle lesioni, che macroscopicamente hanno aspetto crostoso, l'epidermide è estremamente assottigliata o del tutto assente. A questo livello, la superficie cutanea è rivestita da detriti cellulari frammisti ad abbondante essudato ricchissimo di granulociti neutrofili. La colorazione di *Gram* mette in evidenza un gran numero di batteri

Gram positivi a morfologia coccoide.
I vasi sanguigni che risiedono nello strato più superficiale del derma sono estremamente dilatati. Inoltre, il derma appare infiltrato da un gran numero di cellule infiammatorie (linfociti, macrofagi e granulociti neutrofili), la cui presenza diviene particolarmente fitta in prossimità della membrana basale e talvolta in sede perivascolare.
I rilievi istopatologici sopra citati, con particolar riferimento ai quadri lesivi osservati a carico dello strato spinoso dell'epidermide, consentono di emettere la diagnosi di vaiolo suino.

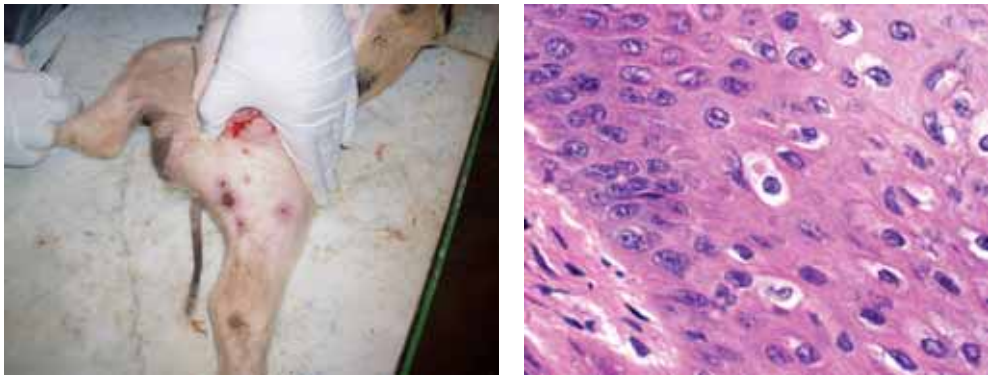


Fig. 1. Le lesioni coinvolgono soprattutto il piatto delle cosce, hanno forma circolare ed aspetto crostoso (a). Istologicamente, i cheratinociti dello strato spinoso appaiono in preda a degenerazione palloniforme. In sede citoplasmatica, è possibile evidenziare la presenza di caratteristiche inclusioni eosinofiliche, alle quali si attribuisce grande valenza diagnostica (b; colorazione con ematossilina-eosina, Ob x 100).

DISCUSSIONE

Il vaiolo suino è una malattia infettiva e contagiosa ad eziologia virale, sostenuta da *Swine Poxvirus* (SPoV) e caratterizzata dalla comparsa di tipiche lesioni cutanee esantematiche (7).
L'agente eziologico appartiene alla famiglia *Poxviridae* ed è l'unico membro del genere *Suipoxvirus*. In condizioni naturali, SPoV è piuttosto resistente ed il virus presente nelle croste cutanee essiccate può rimanere infettante per mesi (3, 7). *In vivo*, lo spettro d'ospite di SPoV è limitato al suino. Diversamente da altri poxvirus, SPoV non replica sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate di pollo; al contrario, replica attivamente su colture cellulari ottenute da rene suino con effetto citopatico (2, 7).
L'infezione sostenuta da SPoV ha diffusione cosmopolita. Ciononostante, la malattia passa spesso inosservata e viene diagnosticata e descritta di rado (7).
Il contagio può stabilirsi per contatto diretto, oppure può essere mediato da ectoparassiti che fungono da vettori meccanici. A tal proposito, si attribuisce un ruolo epidemiologico chiave al pidocchio del suino (*Haematopinus suis)*: ciò giustifica il carattere stagionale della malattia nonché la distribuzione privilegiata delle lesioni in corrispondenza del piatto delle cosce e dell'addome, come rilevato anche nel focolaio di vaiolo suino oggetto

di indagine (3, 5). Possibile l'infezione transplacentare, responsabile di rari episodi di vaiolo congenito (6, 7).
Morbilità e mortalità sono profondamente influenzate dalle condizioni igieniche dell'allevamento e dall'immunità di popolazione. Ad ogni modo, il vaiolo suino ha solitamente decorso benigno, a meno che non intervengano infezioni batteriche secondarie da *Streptococcus* spp o da *Staphylococcus* spp. (3, 7). I dati a nostra disposizione non consentono una valutazione precisa dell'impatto dell'infezione sostenuta da SPoV sulle performance produttive dell'allevamento in oggetto. Tuttavia, l'esclusivo coinvolgimento dei suinetti in fase di *post*-svezzamento induce a ritenere che l'infezione da SPoV sia presente da lungo tempo nell'effettivo in questione.
Analogamente a quanto noto in altre specie animali, le lesioni vaiolose del suino evolvono tipicamente attraverso gli stadi di macula, papula, pustola e crosta, con guarigione nell'arco di 2-4 settimane (3, 4, 5). In diagnosi differenziale si devono considerare: malattie vescicolari, punture di insetti, *pityriasis rosea*, paracheratosi, localizzazioni cutanee di parassiti, reazioni di ipersensibilità, stadi iniziali delle dermatomicosi, epidermiti stafilococciche e streptococciche (2, 3, 5).
In assenza di presidi immunizzanti, la profilassi si basa sul rispetto delle norme igieniche basilari e sul controllo degli ectoparassiti (7).

CONCLUSIONI

Pur in assenza di specifiche indagini epidemiologiche, l'esperienza qui riportata supporta l'ipotesi che l'infezione sostenuta da SPoV sia piuttosto diffusa ma sottostimata, soprattutto in alcune realtà produttive "marginali". Il ricorso razionale alle indagini istopatologiche si dimostra uno strum ento valido, rapido ed economicamente vantaggioso per la risoluzione del quesito diagnostico.

Bibliografia

1. Ballarini G., Martelli P. (1993) "Clinica suina", 1a ed., Bologna, Ed agricole.
2. Farina R., Flammini C.F., Pascucci S., Sidoli L. (1998) "Poxviridae" in: Farina R., Scatozza F. "Trattato di malattie infettive degli animali", 2a ed., Torino, UTET, 453-492.
3. House J.A., House C.A. (1992) "Vaiolo suino" in: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. "Malattie del suino", 7a ed., Padova, Piccin, 437-442.
4. Marcato P.S. (1998) "Patologia Suina", 1a ed., Bologna, Ed agricole.
5. Nimmo-Wilkie J. (1996) "Skin" in: Sims L.D., Glastonbury J.R.W. "Pathology of the pig. A diagnostic guide", 1a ed., Melbourne, The Pig Research and Development Corporation, 329-356.
6. Mazzoni C., Gherpelli M., Dottori M., Merialdi G., Gelmetti D., Lavazza A. (2002) "Descrizione di un episodio di vaiolo suino congenito". Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Piacenza, 14-15 marzo 2002, 303-307.
7. Pensaert M.B. (1989) "Virus infections of porcines", 1a ed., Elsevier Science Publishers B.V.

IL PIANO NAZIONALE PER IL BENESSERE ANIMALE IN ALLEVAMENTO

LUIGI GAIDELLA(**); CARLO CANTONI C. (*)

(*): Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10 Milano
(**) ASL – Mantova

Parole chiave: piano nazionale per il benessere animale in allevamento, materiale manipolabile, arricchimento ambientale

Key words: Italian national plan for welfare of breed animal, material for manipulation, environmental enrichment.

Riassunto
Gli autori esaminano il Piano Nazionale per il Benessere Animale, ed in particolare la ricaduta sull'allevamento dei suini. Il Piano è stato elaborato per rispondere a disposizioni del Regolamento CE 882/04 e ad una richiesta del Food and Veterinary Office (FVO) che nell'ottobre 2006 aveva sottoposto ad audit l'Italia in merito allo stato di attuazione della legislazione sul benessere animale. Le risultanze dell'audit comprendevano diverse raccomandazioni anche per l'allevamento dei suini, tra le quali ne emergevano due in particolare: la necessità di formare gli allevatori e ed il personale addetto alle ispezioni. Sulla base anche di queste risultanze è stato elaborato il Piano che ha avuto una prima fase, nella formazione di personale veterinario che a sua volta formerà i suinicoltori sul benessere animale.

Summary
Italian National Plan on Welfare of Bred Animals
Authors examine Italian National Plan on bred animal welfare, with regard to swine. National Plan was elaborated to join Regulation CE 882/04 and specific FVO (Food and Veterinary Office) requests, which visited Italy during October 2006 e valued state of the art of animal welfare legislation and its application. Audit carried out some recommendations: in swine breed emerged how was necessary that appropriate training course are available for pig farmers, and adequate practical guidance for inspectors. Last year, Health Ministry begins to inform veterinaries who are going to inform swine farmers during 2009.

INTRODUZIONE

Nel mese di ottobre 2006, il Food and Veterinary Office (FVO) ha condotto un audit in Italia per verificare lo stato dell'arte dell'applicazione della normativa in tema di benessere animale tra cui anche l'allevamento suino. Dalle evidenze dell'audit emergono ritardi nell'applicazione della normativa dovuta anche a scarsa divulgazione della stessa.

MATERIALI E METODI

Le raccomandazioni espresse dal FVO nel settore dell'allevamento suino, riguardavano:

a) La necessità di organizzare corsi di formazione per gli allevatori
b) La necessità di formare il personale ispettivo relativamente a valutazioni come l'intensità luminosa e lo spazio libero per gli animali
c) La necessità di un'informazione capillare relativamente al cosiddetto arricchimento ambientale ed il materiale manipolabile
d) Inoltre non si deve soprassedere a carenze come:
    a. la disponibilità continua di acqua anche in allevamenti che utilizzano l'alimentazione liquida o semi liquida;
    b. la disponibilità di box separati per gli animali malati o feriti
    c. la presenza di un sistema di allarme per l'impianto di ventilazione artificiale
    d. una registrazione giornaliera del numero di animali morti
e) la necessità di porre in essere misure adeguate in caso di recidiva da parte dell'al levatore in particolare nel caso di sovraffollamento

Relativamente alla normativa sul benessere dei suini, essa sarà a regime al 1 gennaio 2013, quando terminerà il periodo di deroga concesse alle aziende costruite prima del 2004 che principalmente riguardano:

1. La superficie libera totale per scrofe e scrofette allevate in gruppo.
2. la disponibilità per le scrofe gravide e le scrofette dopo la fecondazione che una parte della predetta superficie libera totale deve essere costituita da pavimento pieno continuo, con determinate superficie minime disponibili. Le scrofe e scrofette devono essere allevate in gruppo nel periodo compreso tra le 4 settimane dopo la fecondazione e una settimana prima della data prevista per il parto.
3. Le scrofe e scrofette devono avere accesso permanente al materiale per le attività di ricerca e manipolazione.
4. la larghezza dei travetti e del fessurato nei pavimenti con grigliato in calcestruzzo

RISULTATI

Dai controlli condotti negli allevamenti da parte del Ministero, dall'attività di verifica sulle Regioni ed ASL, emerge che i principali problemi che si riscontrano sono riferibili a:

1. disponibilità giornaliera di luce ed all'intensità prevista
2. materiale manipolabile
3. sovraffollamento
4. disponibilità di acqua per tutto l'arco delle 24 ore o se gli impianti sono presenti, gli stessi non sono funzionanti.

Nelle intenzioni del Ministero, il Piano Nazionale per il Benessere Animale negli allevamenti (PNBA) nasce dall'esigenza di:

- ottemperare alle disposizioni previste dalle norme nazionali e comunitarie
- rendere uniformi le modalità di esecuzione e la programmazione dei controlli,
- migliorare la formazione dei medici veterinari e degli allevatori relativamente alle tematiche di benessere animale.

L'attività formativa è stata la prima fase del Piano: sono stati formati complessivamente circa 400 veterinari in tutta Italia che dai prossimi mesi incontreranno in assemblea gli allevatori per trasferire le conoscenze. In questo modo tutta la "filiera" sarà informata per aumentare le condizioni di benessere dei suini. Si auspica che il miglioramento delle condizioni di benessere e di allevamento porterà anche ad un miglioramento della qualità dei prodotti, pertanto, tutta questa attività formativa ed informativa persegue non solo l'obiettivo di tutelare il benessere animale per motivazioni etiche, ma è finalizzata anche alla promozione e valorizzazione della produzione nazionale. Una volta formati gli allevatori dovrebbero implementare un piano di autocontrollo aziendale che rispetti i parametri di benessere animale anche per quelli che più creano difficoltà applicative.

CONTROLLI

Mediante la Circolare n. 10 del 5 novembre 2001, il Ministero ha fornito indicazioni in merito alle modalità di esecuzione dei controlli. In particolare è stato puntualizzato che annualmente deve essere effettuato un numero adeguato di ispezioni per la verifica del rispetto del benessere animale negli allevamenti, programmato in base ai seguenti parametri:

1. numero complessivo degli allevamenti;
2. specie animale e caratteristiche produttive;
3. tecnologie di allevamento che determinano maggior incidenza del rischio per il benessere animale;
4. risultati di precedenti ispezioni.

Il PNBA prevede una percentuale minima di controlli del 15% annuale per gli allevamenti con più di 40 capi allevati e/o più di 6 scrofe. Tale percentuale può essere incrementata dalle Regioni sulla base di una loro valutazione del rischio che potrebbe essere diversa da quella ministeriale ovvero allevamenti inferiori a 40 capi e/o con meno di 6 scrofe.
Se non è possibile procedere annualmente all'ispezione di tutti gli allevamenti presenti sul territorio va prevista un'adeguata "rotazione" nel programma dei sopralluoghi, al fine di assicurare che possano essere controllate tutte le aziende entro un tempo stabilito.
Durante l'ispezione l'allevatore deve fornire:

a. la data, l'identificazione del luogo di produzione, i dati ed il codice fiscale del proprietario e del detentore;

Ad ogni categoria di non conformità (violazioni amministrative), corrispondono diverse azioni:

• **categoria A** - non conformità per le quali viene richiesto di rimediare entro un termine inferiore ai tre mesi e non viene comminata nessuna sanzione amministrativa o penale immediata;
• **categoria B** - non conformità per le quali viene richiesto di rimediare entro un termine superiore ai tre mesi e non viene fatta nessuna sanzione amministrativa o penale immediata;
• **categoria C** - non conformità per le quali viene comminata una sanzione amministrativa o penale immediata (vi appartengono i casi più gravi di non conformità e le reiterazioni).

La vigilanza sul benessere animale può essere svolta come attività a sé stante ovvero in occasione di
sopralluoghi programmati presso gli allevamenti per altre finalità (profilassi, controlli sui mangimi, farmaci, anagrafe, etc.). Nel primo caso, il Veterinario ufficiale controllerà tutte le categorie di non conformità previste per la specie in esame. Nel secondo caso devono riguardare almeno 4 categorie (su 14) di requisiti previsti dalla Decisione 778/06 che per i suini sono:

a) Personale;
b) Ispezione e controllo degli animali;
c) tenuta dei registri (Registrazione dei dati)
d) libertà di movimento degli animali
e) spazio disponibile
f) edifici e locali di stabulazione
g) illuminazione minima
h) pavimentazioni
i) materiale manipolabile
j) alimentazione, abbeveraggio ed altre sostanze
k) mangime contenenti fibre
l) mutilazioni
m) procedure di allevamento
n) attrezzatura automatica e meccanica

All'atto dell'ispezione in allevamento per la verifica del benessere animale saranno anche controllati:

a) la presenza e conformità del registro dei trattamenti;
b) la conformità della registrazione di carico e scarico degli animali relativamente alle movimentazioni con particolare riferimento alla mortalità;
c) la presenza di un protocollo/piano di lotta ai sinantropi, in particolare roditori e mosche;
d) l'introduzione in allevamento di animali scortati da un documento,
e) la corretta identificazione degli animali e la registrazione in banca dati anagrafe zootecnica ai sensi della normativa vigente.

DISCUSSIONE

La violazione delle disposizioni normative in materia di benessere dei suini allevati, pur comportando in ogni caso il rilievo e la verbalizzazione dell'irregolarità riscontrata, presuppone di volta in volta una valutazione da parte del Veterinario Ispettore ai fini dell'applicazione delle sanzioni amministrative, che debbono essere sicuramente comminate nei casi di gravi inadempienze o reiterazione delle irregolarità, ma in caso di violazioni di minor entità possono essere applicate delle "prescrizioni", con indicazione dei relativi tempi di adeguamento.

CONCLUSIONI

Il PNBA rappresenta l'evoluzione del controllo in materia di benessere animale che al contrario di altri Piani (per esempio il Piano Nazionale dei Residui, Piano Nazionale sull'Alimentazione Animale, ecc.) è stato preceduto da un'adeguata formazione di tutti gli attori della filiera.

Bibliografia

1. Piano Nazionale per il Benessere Animale – www.ministerosalute.it visitato il 18.1.09
2. Ministero della Salute - DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE E DELLA COMUNICAZIONE DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' VETERINARIA E DEGLI ALIMENTI – UFFICIO X. Procedure per il controllo del benessere animale negli allevamenti di suini - applicazione del D.Lgs. 20 febbraio 2004 n.53.
3. Ministero della Salute – audit sul benessere animale aprile 2007 – www.ministerosalute.it
4. D.lgs 20 febbraio 2004 n. 53
5. Linee Guida Regionali in materia di benessere animale – Regione Lombardia stesura 1.2008

ESPRESSIONE DELLA 5-LIPOSSIGENASI (5-LOX) E DELLA CICLOOSSIGENASI-2 (COX-2) IN CORSO DI PNEUMOPATIE INFIAMMATORIE DEL SUINO: INDAGINI PRELIMINARI

5-LIPOXYGENASE (5-LOX) AND CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) EXPRESSION IN PORCINE INFLAMMATORY LUNG DISEASES: PRELIMINARY INVESTIGATIONS

GIUSEPPE MARRUCHELLA G.[1], ROBERTO GIACOMINELLI-STUFFLER[1], MARINA BAFFONI[1], GIULIO GRANITO[2], MAURO MACCARRONE[1]

[1]***Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro 45, 64100 – Teramo***
[2]***Medico Veterinario, Libero Professionista, Forlì.***

Parole chiave: suino, polmoniti, patogenesi, 5-lipossigenasi, cicloossigenasi-2, eicosanoidi.

Key words: swine, pneumonia, pathogenesis, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2, eicosanoids.

Riassunto. Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e svolgono molteplici attività biologiche. Il presente lavoro si pone l'obiettivo di valutare l'espressione della 5-lipossigenasi (5-LOX) e della cicloossigenasi-2 (COX-2) – enzimi chiave per la produzione rispettivamente di leucotrieni e prostaglandine – e la rilevanza patogenetica delle succitate vie enzimatiche in corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino.
A tal fine, campioni di parenchima polmonare sono stati prelevati sia da suini sani di controllo, sia da suini affetti da polmonite enzootica, da pleuropolmonite e da polmonite interstiziale PCV2-associata. I suddetti campioni sono stati processati e sottoposti ad idonee indagini istopatologiche, immunoistochimiche e biochimiche (*Western blot*, WB).
Nei soggetti di controllo, l'espressione della 5-LOX e della COX-2 è apparsa di modesta entità e pressochè esclusivamente limitata alle cellule dell'epitelio bronchiolare. Per contro, in condizioni patologiche, le stesse indagini immunoistochimiche ed in WB hanno dimostrato una maggiore espressione di entrambi gli enzimi oggetto di studio da parte di una vasta gamma di tipi cellulari.
I risultati delle nostre indagini inducono a ritenere che leucotrieni e prostaglandine possano partecipare attivamente alla patogenesi di differenti pneumopatie infiammatorie del suino.

Summary. *Eicosanoids are products of the arachidonic acid metabolism and play a multitude of biologic actions. The present study aims at investigating the role of 5-lipoxygenase (5-LOX) and cyclooxygenase-2 (COX-2) dependent enzymatic pathways in the pathogenesis of different porcine inflammatory lung diseases (enzootic pneumonia, pleuropneumonia, PCV2-associated interstitial pneumonia).*
Pulmonary tissue samples from healthy control and diseased pigs were collected and processed for histopathological, immunohistochemical, and biochemical investigations (Western blot, WB). In control animals, immunohistochemistry demonstrated both 5-LOX and COX-2 expression, which were almost exclusively limited to the bronchiolar epithelial cells. Diseased pigs showed a stronger

5-LOX and COX-2 specific immunoreactivity, which involved a wide range of cell types, as confirmed by immunohistochemical and WB investigations.
On the basis of what above, our results demonstrate that 5-LOX and COX-2 are differently expressed in normal versus diseased lungs, thus suggesting the likely involvement of both biochemical pathways in the pathogenesis porcine lung inflammatory diseases.

INTRODUZIONE

La patologia respiratoria, nell'accezione più ampia del termine, è causa di ingenti danni economici e sanitari in suinicoltura. L'eziologia delle malattie respiratorie del suino è quantomai complessa e diversificata; infatti, le sindromi respiratorie negli allevamenti intensivi rappresentano il risultato finale dell'interazione fra molteplici microrganismi dotati di potere patogeno (virus, micoplasmi, batteri), nonché fra questi ultimi e fattori "manageriali" di varia natura.
Quanto appena premesso rende ragione della definizione di "complesso respiratorio multifattoriale" (*Porcine Respiratory Disease Complex*, PRDC), la quale racchiude al suo interno l'insieme delle problematiche respiratorie proprie della suinicoltura moderna.
L'avvento di nuovi strumenti investigativi, con particolare riferimento alle tecniche di indagine biomolecolari, ha condizionato positivamente l'approccio diagnostico al PRDC. Parallelamente, nel tempo sono stati sviluppati numerosi presidi terapeutici e profilattici allo scopo di limitare i danni osservati in corso di PRDC (5).
I farmaci anti-infiammatori di comune impiego nella terapia delle sindromi respiratorie svolgono la loro azione inibendo la sintesi degli eicosanoidi. Tuttavia, le conoscenze relative al coinvolgimento patogenetico degli eicosanoidi in corso di pneumopatie infiammatorie del suino risultano al momento lacunose.
Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e regolano una vasta gamma di processi biologici, infiammazione *in primis*. Il metabolismo dell'acido arachidonico può procedere lungo due vie enzimatiche principali: a) lipossigenasi (LOX), responsabili della produzione dei leucotrieni e lipossine; b) cicloossigenasi (COX), responsabili della produzione di prostaglandine e trombossani (8).
Il presente lavoro si pone l'obiettivo di valutare l'espressione della 5-LOX e della COX-2 – enzimi chiave per la produzione rispettivamente di leucotrieni e prostaglandine – e la rilevanza patogenetica delle succitate vie enzimatiche in corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino. L'espressione della 5-LOX e della COX-2 verrà valutata dal punto di vista qualitativo e semi-quantitativo, attraverso idonee indagini morfologiche e biochimiche (*Western blot*, WB).

MATERIALI E METODI

Sono stati finora oggetto di indagine 10 animali così ripartiti: 2 soggetti sani di controllo, 4 suini affetti da polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*, 2 suini affetti da pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 2 suini affetti da "sindrome PCV2-associata" (*Porcine Circovirus type 2 Associated Disease*, PCVAD). In sede autoptica, da ciascun soggetto sono stati prelevati campioni rappresentativi di parenchima polmonare.
I tessuti destinati alle indagini morfologiche sono stati immediatamente fissati in formalina neutra tamponata al 10% ed inclusi in paraffina come di *routine*.
Sezioni di parenchima polmonare sono state colorate mediante ematossilina-eosina per le va-

lutazioni istopatologiche del caso.
L'immunoistochimica nei confronti della 5-LOX è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale caprino (C-19, Santa Cruz Biotecnologies, CA, USA) alla diluizione finale di 1:500. Al fine di ottenere un efficace smascheramento antigenico, le sezioni sono state sottoposte a trattamento termico in tampone citrato 0.01 M (pH 6.0) a 96°C per 45 min. L'immunoistochimica nei confronti della COX-2 è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale caprino (C-20, Santa Cruz Biotecnologies, CA, USA) alla diluizione finale di 1:250. In questo caso, lo smascheramento antigenico è stato ottenuto autoclavando le sezioni tessutali in tampone citrato 0.01 M (pH 6.0) a 121°C per 2 min, come già descritto da Cho e Chae (2002).
I campioni di parenchima polmonare destinati alle indagini in WB sono stati conservati a -80°C e successivamente risospesi in ghiaccio, sonicati e centrifugati. Le concentrazioni proteiche sono state misurate con il metodo Bradford (1976). Gli estratti cellulari proteici (20 µg/pozzetto) sono stati quindi caricati in gel SDS-poliacrilamide al 10% e trasferiti su membrane PVDF. Sono stati utilizzati gli stessi anticorpi primari sopra citati anti-5-LOX (1:500) ed anti-COX-2 (1:1000). Le reazioni sono state sviluppare impiegando un sistema di chemiluminescenza.

RISULTATI

Le indagini istopatologiche hanno documentato l'assenza di lesioni microscopiche nei 2 suini di controllo e, nel contempo, hanno permesso una dettagliata caratterizzazione delle diverse forme morbose oggetto di studio.
Negli animali affetti da polmonite enzootica si è osservata la tipica iperplasia del tessuto linfatico associato ai bronchi (*Bronchial Associated Lymphoid Tissue*, BALT) e, più in particolare, del BALT peribronchiolare. Il lume dei bronchi/bronchioli era spesso occupato da un abbondante infiltrato infiammatorio, costituito in prevalenza da granulociti neutrofili, mentre l'epitelio bronchiolare appariva iperplastico. Si notava, inoltre, il coinvolgimento alveolare con ispessimento dei setti ed iperplasia dei pneumociti di tipo II ("alveolite interstiziale"), mentre il lume degli alveoli conteneva un essudato composto in prevalenza da macrofagi ("alveolite desquamativa").
Nei suini affetti da pleuropolmonite, si notava l'intensa congestione dei setti alveolari, mentre i lumi alveolari erano occupati da fibrina, detriti cellulari e soprattutto da neutrofili degeneranti fusiformi ("*oat cells*"). Si osservavano, inoltre, la marcata dilatazione dei setti interlobulari ed il coinvolgimento pleurico.
Le lesioni microscopiche osservate in corso di PCVAD coincidevano con una classica polmonite interstiziale alveolo-settale, caratterizzata dal marcato ispessimento dei setti alveolari, infiltrati da macrofagi e linfociti, associato ad ipertrofia ed iperplasia dei pneumociti di tipo II.
Le indagini in WB hanno dimostrato l'espressione di entrambi gli enzimi oggetto di studio, sia nei suini sani di controllo sia negli animali affetti da diverse patologie polmonari, confermando la specificità degli anticorpi primari impiegati. Il segnale è risultato più intenso nei campioni "patologici" – soprattutto in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite – rispetto ai soggetti sani di controllo.
In questi ultimi, le indagini immunoistochimiche hanno dimostrato una modesta espressione della 5-LOX e della COX-2, limitatamente alle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare, con *pattern nucleare* e/o citoplasmatico.
L'immunoreattività nei confronti della 5-LOX è apparsa molto più diffusa ed intensa in corso

di polmonite enzootica, soprattutto in corrispondenza delle cellule infiammatorie che occupavano il lume di bronchi, bronchioli ed alveoli. Un chiaro segnale immunoistochimico si è osservato anche all'interno dei pneumociti di tipo II iperplastici, nelle cellule muscolari lisce e nell'endotelio dei vasi sanguigni (soprattutto in sede sub-pleurica), nelle cellule dell'endotelio dei vasi linfatici ed in minor misura nell'epitelio bronchiolare e nei condrociti.
Parimenti diffusa ed intensa è risultata l'immunoreattività nei confronti della 5-LOX in corso di pleuropolmonite, con marcato coinvolgimento anche della superficie pleurica e delle *oat cells*.
Di minore entità è risultata, invece, l'espressione della 5-LOX nelle forme di polmonite interstiziale oggetto di studio, con immunoreattività specifica in corrispondenza dell'epitelio bronchiale/bronchiolare, di macrofagi presenti nei setti alveolari, di piccoli *clusters* di granulociti neutrofili e delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (soprattutto in sede sub-pleurica).
L'espressione della COX-2 è risultata più intensa e soprattutto più diffusa rispetto alla 5-LOX in tutti i campioni "patologici" oggetto di indagine, raggiungendo i massimi livelli in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite. L'immunoreattività specifica nei confronti della COX-2 si è rivelata particolarmente marcata in corrispondenza delle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare e delle ghiandole bronchiali, delle cellule infiammatorie (soprattutto macrofagi alveolari) e dell'endotelio dei vasi sanguigni. Da sottolineare l'intensa immunoreattività osservata in sede pleurica in corso di pleuropolmonite.

DISCUSSIONE

L'enzima 5-LOX ha importanza cruciale nella sintesi dei leucotrieni, potenti fattori vasoattivi e spasmogeni coinvolti in diversi processi patologici. Si ritiene che i leucotrieni possano intervenire attivamente nella patogenesi di molte malattie, anche a carico dell'apparato respiratorio (11).
I risultati delle nostre indagini dimostrano che la 5-LOX è fisiologicamente espressa dal parenchima polmonare e che la via enzimatica 5-LOX-dipendente viene attivata nel corso di differenti pneumopatie infiammatorie del suino, il che suggerisce il coinvolgimento attivo dei leucotrieni nella patogenesi delle malattie oggetto di studio. Al riguardo, gli approcci investigativi impiegati – immunoistochimica e WB – concordemente indicano che l'espressione della 5-LOX è particolarmente esaltata in corso di polmonite enzootica e di pleuropolmonite.
Si è a lungo ritenuto che la 5-LOX fosse espressa in quantità apprezzabili soltanto dai "leucociti". Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che il *range* dei tipi cellulari in grado di esprimere la 5-LOX è ben più ampio (6, 7, 9). In accordo con quanto sopra, i risultati delle nostre indagini dimostrano che anche le cellule epiteliali dei bronchi/bronchioli, i pneumociti, le cellule muscolari lisce, le cellule endoteliali ed i condrociti possono partecipare attivamente alla sintesi dei leucotrieni in corso di pneumopatie infiammatorie del suino.
È interessante notare che l'espressione della 5-LOX è indotta in modo differente e specifico a seconda della malattia in atto e dell'eziologia della stessa. Ad esempio, in nessuno dei campioni oggetto di studio si è osservata immunoreattività specifica nella muscolatura liscia bronchiolare; quest'ultima risulta, al contrario, intensamente immunoreattiva in corso di broncopolmonite verminosa del suino (10).
La COX esiste in due isoforme distinte: a) la COX-1 è espressa in modo "costitutivo" da parte di molti tipi cellulari; b) la COX-2 è "indotta" in seguito all'azione di stimoli pro-

infiammatori (8). Tale distinzione non è tuttavia esente da critiche. In linea con la letteratura più recente (12) i nostri dati confermano che la COX-2 viene espressa, seppur in quantità modeste, anche in condizioni fisiologiche. Nel contempo, le nostre indagini confermano il carattere altamente "inducibile" della COX-2 in corso di malattie polmonari a carattere infiammatorio (3, 4).

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati delle nostre indagini indicano che le vie biochimiche 5-LOX-dipendente e COX- 2-dipendente sono entrambe esaltate nel corso di pneumopatie infiammatorie del suino sostenute da agenti eziologici diversi e caratterizzate da quadri lesivi specifici.

Bibliografia

1. Bradford M.B. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". Anal Biochem 72, 248.
2. Cho W.S., Chae C. (2002) "Immunohistochemical detection of cyclooxygenase-2 in lungs of pigs naturally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". J Comp Pathol 127, 274-279.
3. Cho W.S., Chae, C. (2003) "Expression of cyclooxygenase-2 in swine naturally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". Vet Pathol 40, 25-31.
4. Cho W.S., Chae C. (2004) "Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". Vet Pathol 41, 666-672.
5. Halbur P.G. (1997) "Porcine Respiratory Disease Complex". Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. http://mark.asci.ncsu.edu/HealthyHogs/book1997/halbur2.htm.
6. James A.J., Penrose J.F., Cazaly A.M., Holgate S.T., Sampson A.P. (2006) "Human bronchial fibroblast express the 5-lipoxygenase pathway". Respir Res 7, 102.
7 Komatsu N., Natsui K., Ueda N., Watanabe K., Yamamoto, S. (1991) "Immunohistochemical study on arachidonate 5-lipoxygenase in porcine leukocytes and other tissues". J Histochem Cytochem 39, 655-662.
8. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N. (2007) "Robbins Basic Pathology", 8a ed., USA, Saunders Elsevier.
9. Luo M., Lee S., Brock T.G. (2003) "Leukotriene synthesis by epithelial cells". Histol Histopathol 18, 587-595.
10. Marruchella G., Giacominelli-Stuffler R., Baffoni M., Maccarrone M. (2008) "Ruolo dell'enzima 5-lipossigenasi (5-LOX) nella patogenesi della broncopolmonite verminosa del suino: indagini immunoistochimiche e biochimiche". Atti del V Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria, Palermo, 15-16 maggio 2008, 69.
11. Peters-Golden M., Henderson W.R. (2007) "Leukotrienes". N Engl J Med 357, 1841-1854.
12. Zidar N., Odar K., Glavac D., Jerse M., Zupanc T., Stajer, D. (2008) "Cyclooxygenase in normal human tissues – is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?". J Cell Mol Med, epub ahead of print.

MONITORAGGIO DELLA SIEROPOSITIVITÀ E DEL TITOLO ANTICORPALE PER IL VIRUS DELLA MALATTIA DI AUJESZKY IN ALLEVAMENTI SUINI DA INGRASSO E DA RIPRODUZIONE.

EVALUATION ON SEROPOSITIVITY AND ANTIBODY TITRE FOR AUJESZKY'S DISEASE IN FATTENING AND FARROW TO FEEDER HERDS.

MARTANO G.*., FEDELE V.*., RIGANO R.*
Servizio Veterinario-Sanità animale 1- ASL TO3, Pinerolo

Parole chiave: Sieroprevalenza, malattia di Aujeszky, Elisa, efficacia della vaccinazione in allevamenti da ingrasso.

Key words: seroprevalence, Aujeszky's disease, Elisa, efficacy of vaxination in fattening farms.

Riassunto. Il controllo ed eradicazione della malattia di Aujeszky rappresenta un obiettivo non ancora pienamente raggiunto. Scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere una valutazione sulla prevalenza di sieropositività verso la Malattia di Aujeszky in allevamenti suini da ingrasso e da riproduzione, situati nella provincia di Torino. E' stato valutato inoltre il titolo anticorpale di suini sieronegativi presenti in allevamenti da ingrasso per verificare l' efficacia della vaccinazione.
L'indagine è stata condotta nel periodo 2007-2008 su 64 allevamenti suini, di cui 34 da riproduzione e 30 da ingrasso, sono stati testati 2117 suini nel corso di 152 interventi in azienda.
E' stata evidenziata una sieropositività del 6,1 % negli allevamenti da riproduzione e del 13,5 % negli allevamenti da ingrasso.
Negli allevamenti da ingrasso negativi si è rilevata una significativa percentuale di soggetti con scarsa protezione vaccinale.

Abstract. Control and eradication for Aujeszky'disease represents a target still to be reached. The aim of this work is to obtaine an evaluation for serositivity prevalence Aujeszky's disease in farrow to feeder and fattening herds. The antibodies titres has been evaluated on pigs in fattening herds. The examination has been carried out on 64 herds in the period 2007-2008.
2117 pigs were tested during 152 inspections. Seropositivity prevalence in farrow to feeder herds was 6,1% and in fattening herds was 13,5%. In seronegative fattening herds a significant percentage of pigs with low antibodies titres has been observed.

INTRODUZIONE

La malattia di Aujeszky è una patologia infettiva sostenuta da un Alfa2-herpesvirus che trova la specie suina come ospite d'elezione. Nel suino la malattia ha carattere contagioso e può dare origine a quadri clinici differenti: forma nervosa con ence-

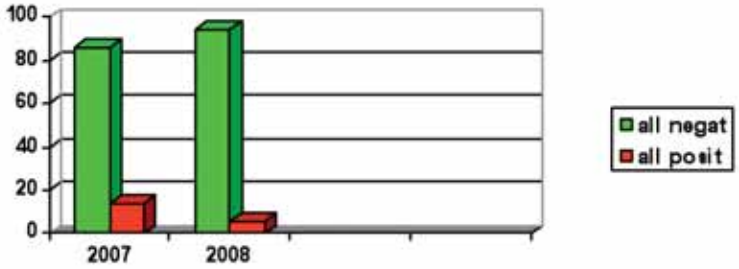
falite acuta nei soggetti sotto scrofa, sindrome respiratoria nei suini in accrescimento e sindrome riproduttiva con aborti ed ipofertilità nelle scrofe. L'obbligo della profilassi vaccinale ha determinato la quasi scomparsa delle forme cliniche classiche che hanno lasciato il posto a sindromi con sintomatologie meno evidenti che sono responsabili di danni economici in termini di performance riproduttive e produttive. Si può riscontrare aumento della mortalità e dei costi sanitari per le forme respiratorie secondarie, aumento di aborti e riassorbimenti fetali e riduzione degli incrementi ponderali. Dalla entrata in vigore del Decreto Ministeriale 01/04/1997 sono trascorsi ormai più di undici anni e la sieropositività verso la malattia di Aujeszky rappresenta ancora un problema rilevante negli allevamenti suini.
Nel corso di questa indagine, che è stata effettuata negli anni 2007-2008 si è cercato di individuare la prevalenza di allevamenti sieropositivi verso la malattia di Aujeszky in aziende suinicole da riproduzione e da ingrasso situate nella provincia di Torino, nel territorio di competenza dell' ASL To3.
Sono stati sottoposti a prelievo un numero significativo di allevamenti suini da ingrasso che normalmente non vengono testati nel corso del piano nazionale di eradicazione, pur rappresentando un indicatore importante della presenza o meno del virus, scelti a random al fine di valutarne la prevalenza di sieropositività. In questi allevamenti da ingrasso è stata effettuata una ricerca per anticorpi totali gB, prevalentemente su soggetti di età superiore ai 6 mesi per verificare l' efficacia della vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Negli anni 2007-2008, nel corso di questa indagine sono stati testati 2117 suini da 64 allevamenti con 152 interventi in azienda.
Gli allevamenti in esame erano composti da 34 aziende da riproduzione e 30 da ingrasso, scelti a random, di varie tipologie e dimensioni, opportunamente individuati sul territorio.
Si è cercato di porre particolare attenzione che i soggetti testati rappresentassero un campione significativo della popolazione in allevamento al fine di ottenere una fotografia il più possibile attendibile della situazione sanitaria verso la malattia di Aujeszky all' interno dell' allevamento.
I campioni di siero prelevati sono stati sottoposti a test Elisa per la ricerca di anticorpi PRV presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sezione di Torino.

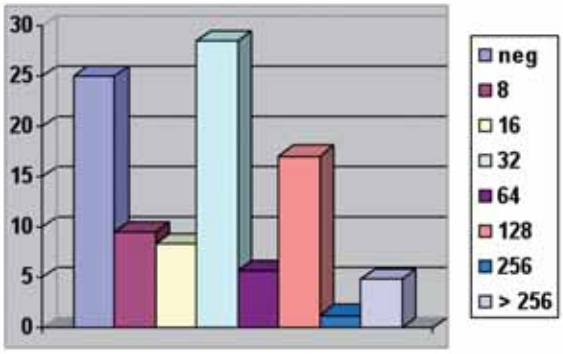
RISULTATI

Per quanto riguarda la sieropositività negli allevamenti da riproduzione si è rilevata una prevalenza relativamente bassa. Gli allevamenti sieropositivi sono risultati il 13,5% nel 2007 ed il 6,1% nel 2008. La prevalenza sui singoli soggetti positivi è risultata del 1,21% nel 2007 e del 0,44% nel 2008.



Nei 30 allevamenti all' ingrasso testati si è evidenziata una sieropositività del 13,3% (4 allevamenti su 30) mentre nei singoli capi testati la prevalenza è risultata del 5,34% (25 soggetti su 468).
Su 396 soggetti negativi alla glicoproteina E è stata eseguita la ricerca anticorpi anti PRV specifici per la glicoproteina gB (anticorpi totali) ed i risultati hanno evidenziato una rilevante percentuale (25,1%) di suini con scarsa protezione vaccinale. Il cut off è stato considerato la diluizione 1:4.

Ac totali (gB) :	
campioni negativi	25,1%
campioni positivi 1:8	9,5%
campioni positivi 1:16	8,3%
campioni positivi 1:32	28,4%
campioni positivi 1:64	5,6%
campioni positivi 1:128	17,1%
campioni positivi 1:256	1,2%
campioni positivi >256	4,8%



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'entrata in vigore del Decreto Ministeriale primo aprile 1997, che stabilisce l'obbligatorietà della vaccinazione con vaccino deleto, oltre a prescrivere accurate norme igieniche e di biosicurezza, si riscontra ancora in Italia una significativa presenza di allevamenti sieropositivi.
Il mancato raggiungimento degli obiettivi previsti dal piano possono essere diversi e tra questi la non corretta vaccinazione nei termini e modi prescritti è sicuramente una delle più importanti.
Le cause che portano a rilevare suini con scarsa protezione vaccinale possono essere legate ad errata profilassi di base effettuata con modalità non idonee oppure alla mancata esecuzione della terza vaccinazione che non consentirebbe di mantenere un titolo anticorpale adeguato a proteggere dall' infezione il suino. Una corretta applicazione delle misure igieniche e di biosicurezza, conseguente a prescrizioni for-

mulate dai Servizi Veterinari che peraltro tenderebbero ad innalzare la sensibilità degli allevatori sui rischi sanitari, associata ad una profilassi vaccinale effettuata rispettando i tempi e modi prescritti porterebbe ad una radicale riduzione dei danni economici provocati dalla Malattia di Aujeszky.

Bibliografia

Alborali L., Guadagnini G., Accini A., Zanoni M., Salogni., 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 ed Allevamento dei Suini, Modena 29-30 marzo 2007, 283-287.

Bolla C. (2005) "Monitoraggio della Malattia di Aujeszky, applicazione 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.

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 ed Allevamento dei Suini, Modena 29-30 marzo 2007, 359-364.

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.

Sona B., Origlia S., Viara S., Careddu M.E., Rosso F., (2007) "Progetto Aujeszky 2007" della Regione Piemonte. Atti del XXXIV Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Salsomaggiore terme 13-14 marzo 2008, 437-444.

Tamba M., Calabrese R., Finelli., Cordioli., (2002) "Risk factors of Aujeszky's disease seropositivity of swine herds 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.

PREVALENZA DI ANTICORPI ANTI-HEV IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA

PREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS ANTIBODIES AMONG PIGS IN NORTHERN ITALY

N.MARTINELLI, A.LUPPI, D.LELLI, E.SOZZI, E.CANELLI, A.M.MORENO MARTIN, R.FONTANA, A.LAVAZZA, G.F.LOMBARDI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia

Parole chiave: Epatite E, Suino, Sieroprevalenza.

Key words: Hepatitis E virus, Swine, Seroprevalence.

Riassunto. Il virus dell'epatite E (HEV), virus ad RNA appartenente al genere *Hepevirus*, unico membro della famiglia *Hepeviridae*, è attualmente suddiviso in quattro principali genotipi ed in un unico sierotipo.
Un'indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV è stata condotta in 1422 sieri suini, provenienti da 39 allevamenti (17 a ciclo aperto, 10 a ciclo chiuso e 12 ingrassi), mediante un test ELISA del commercio utilizzato per la diagnosi sierologica di HEV nell'uomo ed opportunamente modificato per il suo impiego nel suino. La presenza di anticorpi anti-HEV è stata dimostrata in 714 sieri (50,21%) ed in 38 allevamenti (97,43%). L'elevata sieroprevalenza riscontrata conferma che il virus dell'epatite E è probabilmente endemico e sta circolando attivamente in numerosi allevamenti suini italiani.

Abstract. *The Hepatitis E virus (HEV), the causative agent of hepatitis E, is a non enveloped RNA virus, belonging to genus Hepevirus, the only member of the Hepeviridae family. HEV is classified into four major genotype but only one serotype is identified. A survey to detect antibodies against hepatitis E virus was undertaken on 39 Italian pig farms (17 farrow to feeder, 10 farrow to finish and 12 fattening enterprises). For the study 1422 pig sera samples were tested using a commercial indirect ELISA, originally developed for testing human sera and properly adapted for the analysis of pig sera. 38 of the farms (97,43%) were positive for anti-HEV IgG antibodies and 714 of 1422 sera samples resulted positive (50,21%). The study confirm that HEV is spread in pigs in Italy and is probably endemic in many farms.*

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 (10). 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) (8). Nell'uomo HEV è trasmesso principalmente per via orofecale 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%. 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 (1). 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 (9). Le modalità di contagio riconoscono principalmente la via oro-fecale e la trasmissione è più efficace in animali posti a stretto contatto (6). 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 (12). La presenza di anticorpi anti HEV è stata dimostrata in numerosi animali domestici (suino, bovino, cane, cavallo) e selvatici (cinghiale, cervo e numerosi roditori). Studi di sieroprevalenza nei suini condotti in diversi Paesi dimostrano che la circolazione di HEV costituisce un evento tutt'altro che sporadico.
La ricerca di HEV con tecnica nested RT-PCR, eseguita negli allevamenti italiani in precedenti studi, ha riportato prevalenze del 40% e del 100% (3;5) ma non sono disponibili dati riguardanti la sieroprevalenza.
Nel presente lavoro è stato eseguito un monitoraggio sierologico su campioni di sangue suino, prelevati in allevamenti ubicati nel Nord Italia e scelti in modo da ottenere un campionamento rappresentativo per quanto riguarda le diverse tipologie produttive e l'età degli animali.

MATERIALI E METODI

I campioni di sangue suino da sottoporre ad indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV sono stati raccolti nel primo semestre 2008, in concomitanza con il campionamento eseguito nell'ambito del monitoraggio sierologico del piano nazionale di eradicazione e sorveglianza della Malattia Vescicolare e sorveglianza della Peste Suina Classica. Il monitoraggio sierologico ha coinvolto 39 aziende (17 a ciclo aperto, 10 a ciclo chiuso e 12 ingrassi (tabella 1) distribuite sul territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Tabella 1: Dati riassuntivi relativi alle aziende sottoposte all'indagine sierologica per HEV.
Table 1: Data of swine herds submitted to HEV serological survey.

Tipologia d'allevamento	Numero di allevamenti testati	Consistenza media	N°medio di scrofe	Sieroprevalenza min-max	Sieroprevalenza media
Ciclo chiuso	10	2600	207	0-94,1	62%
Ciclo aperto	17	1767	268	21,6-100	66%
Ingrasso	12	2247	-	3,6-81,3	31%

Negli allevamenti a ciclo chiuso il numero medio di capi presenti era di 2600 (minimo 18, massimo 9740), in quelli a ciclo aperto di 1767 (minimo 69, massimo 4800) e per gli ingrassi di 2247 (minimo 1035, massimo 7700). Negli allevamenti a ciclo chiuso ed in quelli a ciclo aperto era presente un numero medio di riproduttori pari a 207 e 268 rispettivamente. Nella tabella 2 sono riportati i campioni testati per tipologia produttiva.

Tabella 2: Campioni sottoposti a test sierologico.
Table 2: Number of samples tested for HEV.

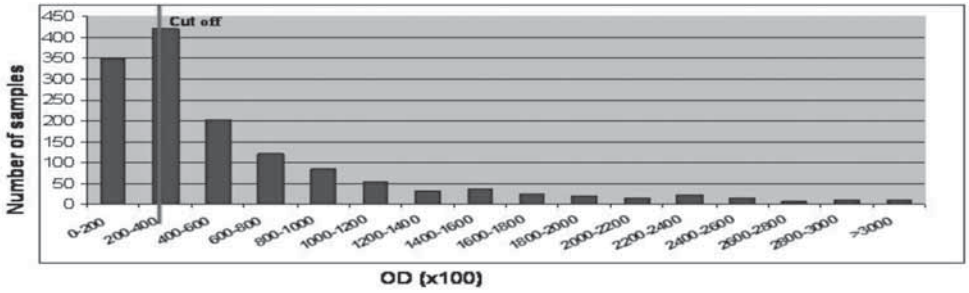
Tipologia produttiva	N° campioni
Scrofe	633
Lattonzoli	58
Magroncelli	133
Magroni	325
Grassi	273
Totale	1422

La media degli animali testati per allevamento è stata del 10% con valore massimo del 100% e minimo dello 0,36%. In totale sono stati testati 1422 campioni, impiegando un test ELISA indiretto del commercio (DIA.PRO®), utilizzato per la diagnosi sierologica di HEV nell'uomo ed opportunamente modificato per il suo impiego nel suino. Il test si è basato sull'impiego di micropiastre attivate con antigeni HEV specifici derivati da ceppi virali Messicani e Birmani (4). I campioni sono stati testati in un unica diluizione 1/100 e gli anticorpi eventualmente presenti nei sieri, legati agli antigeni presenti sui pozzetti, sono stati messi in evidenza da un siero policlonale di capra del commercio (Serotec®) anti-IgG di suino coniugato con perossidasi (HRP). La successiva lettura delle piastre tramite spettrofotometro ha consentito la valutazione delle densità ottiche e la loro collocazione fra i risultati negativi o positivi per la presenza di anticorpi anti-HEV. Il valore di cut-off di 0,274 è stato calcolato sommando 3 deviazioni standard alla media aritmetica dei valori di OD di 80 controlli negativi provenienti dai suinetti SPF allevati presso lo Stabulario dell'IZSLER. Come controllo positivo è stato impiegato un siero suino ottenuto in seguito ad infezione sperimentale (7), mentre come controllo negativo il siero di un suino SPF dello Stabulario dell'IZSLER. Il test del $\chi 2$ è stato impiegato per confrontare i risultati ottenuti. Un valore di $P<0.01$ è stato considerato come soglia di significatività statistica.

RISULTATI

I valori di OD rilevati sono riportati nel grafico 1. I valori sono compresi tra 0,045 e 3,369, con una media di 0,52 (DS: 0,62). Usando il valore di cut-off di 0,274, 38 aziende su 39 (97,43%, 95% CI: 92,5-100%) hanno almeno un campione positivo e 714/1422 campioni di siero (50,21%, 95% CI: 47,7-52,8%) sono positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV.

Grafico 1: Valori di OD dei campioni testati per anticorpi anti-HEV
Figure 1: OD values of samples tested for HEV antibodies.



La media di OD dei valori positivi è di 0,914 (standard deviation: 0,67). La categoria produttiva caratterizzata dalla sieroprevalenza più elevata è risultata essere quella delle scrofe, con una percentuale di animali positivi pari al 70,6% (95% CI: 67-74,1%). Il numero più basso di animali sieropositivi è stato osservato tra i lattonzoli, con una percentuale del 12,1% mentre magroncelli, magroni e grassi hanno presentato percentuali di sieropositività rispettivamente del 30,8%, del 41,5% e del 30,8% (tabella 3). I campioni sono stati inoltre suddivisi arbitrariamente in due gruppi, in funzione dell'età degli animali (gruppo 1, costituito dalle scrofe e gruppo 2, costituito dalle altre categorie produttive e tendenzialmente con età inferiore a 7 mesi). In tal modo, l'analisi statistica dei risultati forniti dai due gruppi sopraccitati ha evidenziato nelle scrofe una frequenza di positivi significativamente maggiore rispetto agli animali del gruppo 2 ($\chi 2$ = 166.91 P<0.00001).

Tabella 3: Campioni positivi suddivisi per tipologia produttiva
Table 3: Positive samples and production phases

Tipologia produttiva	N° campioni positivi	% (95% CI)
Scrofe	447 su 633	70,6 (67-74,1%)
Lattonzoli	7 su 58	12,1 (3,7-20,4%)
Magroncelli	41 su 133	30,8 (23-38,7%)
Magroni	135 su 325	41,5 (36,2-46,9%)
Grassi	84 su 273	30,8 (25,3-36,2%)
Totale	714 su 1422	50,2 (47,6-52,8%)

Gli allevamenti a ciclo aperto ed a ciclo chiuso sono stati arbitrariamente suddivisi in 2 gruppi sulla base del numero di riproduttori presenti (gruppo A aziende con >200 riproduttori e gruppo B aziende con <200 riproduttori). Le aziende del gruppo A hanno una frequenza di positivi significativamente maggiore rispetto alle aziende con meno di 200 riproduttori ($\chi 2$ = 29.78 P<0.00001). Considerando la sieroprevalenza in relazione

alle tre tipologie produttive analizzate, questa si assesta in media intorno al 66% per le aziende a ciclo aperto, al 62% per le aziende a ciclo chiuso e al 31% per le aziende da ingrasso. All'interno dei tre gruppi sopraccitati esistono delle radicali differenze: tra i 17 allevamenti a ciclo aperto quattro allevamenti hanno presentato una sieroprevalenza superiore al 90%, sette tra il 60-90% e sei tra il 20-50%. Tra i 10 allevamenti a ciclo chiuso, due hanno presentato una sieroprevalenza maggiore al 90%, quattro tra il 60% e l'85%, due tra il 30-60% e due tra l'1% ed il 3%. Infine tra i 12 allevamenti di ingrasso, uno solo ha presentato una sieroprevalenza superiore all'80%, in tre aziende i valori erano compresi tra il 46 e il 66%, in cinque tra il 20 ed il 30%, ed in una la percentuale degli animali sieropositivi era inferiore al 5%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dall'indagine sierologica per la ricerca di anticorpi anti-HEV hanno dimostrato una elevata percentuale di suini sieropositivi, sebbene con prevalenze differenti a seconda dell'età degli animali. Tali differenze sono dovute alla dinamica dell'infezione nella specie suina, ampiamente influenzata dall'andamento dell'immunità materna. In particolare la quantità di IgG assunte tramite il colostro dai suinetti e la durata dell'immunità passiva, sarebbero direttamente proporzionale al titolo anticorpale della madre. L'immunità passiva preserverebbe dall'infezione i suinetti mediamente fino alla nona settimana di vita, successivamente alla quale si osserverebbero la maggior parte delle sieroconversioni, con comparsa delle IgG intorno alla quindicesima settimana d'età. Non stupisce pertanto che la prevalenza più elevata sia presente nelle scrofe, come descritto anche negli allevamenti Spagnoli (11) e che nei magroncelli, animali fino 50 kg di peso (14-16 settimane di età) la percentuale di campioni positivi sia più bassa rispetto a quella riscontrata nei magroni (animali fino a circa 28 settimane d'età). Nei grassi la percentuale degli animali sieropositivi appare nuovamente in flessione rispetto ai magroni. Il rimescolamento di animali di diversa provenienza nelle aziende da ingrasso, potrebbe aver influenzato in tal senso il dato riportato. La percentuale di animali sieropositivi varia ampiamente da un allevamento all'altro, ed è pertanto possibile osservare aziende in cui la percentuale relativa di animali sieropositivi è prossima allo 0% ed altre dove questa raggiunge il 100%. Esiste tuttavia una maggiore prevalenza, indipendente dalla tipologia aziendale, negli allevamenti con più di 200 riproduttori ed in generale nelle aziende con una maggiore consistenza. In confronto ai dati di sieroprevalenza di altri Paesi europei, la nostra percentuale del 50% di sieropositivi si assesta sotto ai valori rilevati nel Regno Unito, 85,5% (2), in Spagna, 77,6% (11), e in Svezia, 58% (2), ma superiore a quella descritta in Germania (23,5%) (2). Il test ELISA impiegato, pur basandosi sull'impiego di antigeni provenienti da ceppi Birmani e Messicani di origine umana ed appartenenti rispettivamente ai genotipi I e II, ha dimostrato una buona efficienza nello svelare la presenza di IgG anti-HEV nei campioni di siero suino testati. Questo dimostra che i ceppi sopraccitati possiedono epitopi che vengono riconosciuti dalle IgG suine anti-HEV e che pertanto sono comuni a quelli presenti nei ceppi appartenenti al genotipo 3, tipico del suino e per il quale è stata dimostrata la presenza in Italia.
In conclusione i dati ottenuti dal presente lavoro, evidenziano valori di sieroprevalenza piuttosto elevati ed indicativi di una attiva circolazione di HEV negli allevamenti suini del nord Italia.

Bibliografia

1. Aggarwal R., Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2000 Jan;15(1):9-20.
2. Banks M., Heath G.S., Grierson S.S., King D.P., Gresham A., Girones R., Widen F., Harrison T.J. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. Vet. Rec. 2004 Feb 21;154(8):223-7.
3. Caprioli A., Martelli F., Ostanello F., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Del Chiaro L., Tolari F. Dection of hepatitis E virus in Italian pig herds. Vet. Record 2007; 161, 422-423.
4. Dawson G.J., Chau K.H., Cabal C.M., Yarbough P.O., Reyes G.R., Mushahwar I.K. Solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. Journal of virological methods. Giugno 1992. Vol. 38, Issue 1, 175-186.
5. Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. Vet. Microbiol. 2008
6. 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.
7. 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 contenente il virus dell'epatite E (HEV). Atti della Società Italiana di patologia ed allevamento dei suini. 2008, p.451-458.
8. Lu L., Li C., Hagedorn C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Reviews in medical virology. 2006 Jan-Feb;16(1):5-36.
9. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997; 94: 9860–9865.
10. Reyes G.R., Yarbough P.O., Tam A.W., Purdy M.A., Huang C.C., Kim J.S., Bradley D.W., Fry K. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Gastroenterologia Japonica. 1991 Lugl;26 Suppl 3:142-7.
11. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M.Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. Vet J. 2008 Jan;175(1):130-2.
12. Williams T.P.E., Kasorndorkbua C., Halbur P.G., Haqshenas G., Guenette D.K., Toth T.E., Meng X.J. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. Journal of Clinical Microbiology. 2001 Sept, p. 3040-3046, Vol. 39, No. 9.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE IN FASE PRE-MACELLAZIONE DI UNA FONTE DI ACIDO FORMICO E ACIDO CITRICO PROTETTO (FORMYL®) SULLA PREVALENZA DI SUINI PORTATORI DI *SALMONELLA* SPP. AL MACELLO

EFFECT OF PRE-SLAUGHTER DIET INTEGRATION WITH A PROTECTED SOURCE OF FORMIATE AND CITRIC ACID (FORMYL®) UPON THE PREVALENCE OF SALMONELLA SPP CARRIER SLAUGTHER PIGS

MERIALDI G.[1], FONTANA M.C. [1], TALLARICO N. [4],TURCI S. [2], LEONELLI R. [3], GALLETTI G. [1], VINCENZI E. [4], RUGNA G., BONILAURI P. [3]

[1]***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Bologna***
[2]***Veterinario Libero Professionista (Reggio Emilia)***
[3]***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Reggio Emilia***
[4]***Soda Feed Ingredients (Monaco)***

Parole chiave: suino, *Salmonella*, acido formico

Keywords: swine, *Salmonella*, formic acid

Riassunto. In una prova di campo è stata testata l'efficacia di un additivo zootecnico incapsulato a base di una fonte di acido formico e acido citrico (Formyl®) nel ridurre la prevalenza di soggetti portatori di *Salmonella* spp. nei linfonodi mesenterici e nel contenuto ciecale al momento della macellazione. La prova è stata condotta su suini provenienti da un allevamento a ciclo chiuso sito in Emilia Romagna dove era stato precedentemente registrato un elevato tasso di sieropositività nei confronti di *Salmonella*. Il gruppo trattato ha ricevuto la dieta di finissaggio con l'aggiunta di 4 Kg di Formyl® per tonnellata di mangime negli ultimi 30-50 giorni prima della macellazione, mentre al gruppo di controllo è stata somministrata la dieta commerciale dell'azienda. Al momento della macellazione per ogni partita (sia dal gruppo trattato che dal gruppo di controllo) si è proceduto a prelevare dagli stessi soggetti un campione di contenuto ciecale ed un campione di linfonodi meseraici, per un totale di 100 soggetti nel gruppo di controllo e di 104 soggetti nel gruppo trattato. Dai campioni è stata eseguita la ricerca di Salmonella spp. Attraverso un test standard. La prevalenza di soggetti portatori è risultata significativamente inferiore nel gruppo trattato (28,8%), rispetto al gruppo di controllo (43%).

Abstract. This field trial was carried out to determine the effects of feed acidification with a protected source of formiate and citric acid (Formyl®) upon *Salmonella* carriage in market-age pigs. A group of pigs from an Italian pig herd with high level of infection with *Salmonella* was included. Pigs were randomly divided into two groups: the experimental one received for 30-50 days prior to slaughter a commercial diet supplemented with formic acid source

(Formyl®), and the control pigs received the same diet but unacidified. At slaughter 100 pigs (control group) and 104 pigs (experimental group) were submitted to collection of caecal content and mesenteric lymph nodes for *Salmonella* isolation using standard procedures. The results revealed a significant decrease of the rate of carriers in the experimental group.

INTRODUZIONE

Salmonella spp. rappresenta un importante problema per l'industria suinicola. L'infezione del suino nella maggior parte dei casi decorre in maniera asintomatica e gli animali infetti si comportano come portatori sani. Mantenendo questo stato fino alla macellazione, essi rappresentano la fonte di contaminazione delle carcasse e dei prodotti da esse derivati e quindi un potenziale rischio per la salute dell'uomo.
Il Regolamento (CE) n. 2160/2003 contiene disposizioni per il controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonosici specifici presenti negli alimenti. Dette disposizioni impongono la fissazione di obiettivi comunitari aventi lo scopo di ridurre entro un termine prestabilito la prevalenza di *Salmonella* a livello della produzione primaria coinvolgendo anche tutte le altre fasi della catena alimentare, compresa la produzione di prodotti alimentari e mangimi. La European Food Safety Agency (EFSA) ha pubblicato nel maggio del 2008 la prima parte di un report finalizzato alla stima della prevalenza di *Salmonella* spp. nei suini destinati al macello (Anonimo 2008, Part A). Questa indagine ha messo in evidenza che nella UE al momento della macellazione, un suino su dieci (10,3%) alberga *Salmonella spp*. nei linfonodi mesenterici e in questo contesto l'Italia si classifica all'ottavo posto, con una prevalenza osservata del 16,5%. La Task Force dell'EFSA ha pubblicato di recente la parte B del *report*, dedicata all'analisi dei fattori di rischio relativi all'infezione da Salmonella nei suini da ingrasso in tutta la UE (Anonimo 2008, Part B). Da qui emerge che per ridurre la presenza di Salmonella nei suini e nelle loro carni è necessario mettere in atto strategie di controllo in allevamento che richiedono un approccio integrato su più fronti in considerazione della tipologia aziendale e della situazione epidemiologica interna a ciascun Paese. Ogni Paese membro dovrà a breve predisporre un Piano di Controllo Nazionale attraverso il quale raggiungere gli obiettivi di riduzione che saranno stabiliti. Sarà quindi fondamentale conoscere quali strumenti possano essere utilizzati con profitto a livello aziendale. In questo contesto abbiamo voluto valutare l'efficacia di un acido organico (Formyl®) nella fase che precede la macellazione, quale strumento complementare di riduzione della prevalenza di soggetti portatori di *Salmonella spp*. al macello.

MATERIALI E METODI

Campioni

La prova è stata condotta in un'azienda a ciclo chiuso dell'Emilia Romagna che presentava elevati valori di sieropositività per *Salmonella spp*. La scelta dell'allevamento è avvenuta in seguito a esami sierologici preliminari su un campione di 30 scrofe presenti in azienda e di 21 grassi al macello. Nei reparti di magronaggio e ingrasso al momento della prova i suini erano allevati in ciclo continuo su pavimento pieno. I suini erano alimentati con sistema di alimentazione a broda con somministrazione ad *libitum*. L'azienda utilizzava un mangime commerciale, ma formulato dal proprio formulista. I suini venivano spostati nel sito di in-

grasso a circa 60-70 Kg di peso e vi permanevano fino alla macellazione, che avviene a circa 160 Kg.
30 giorni prima della data prevista per l'invio delle prime due partite al macello è stato iniziato il trattamento. Il gruppo controllo ha ricevuto la dieta commerciale dell'azienda, mentre al gruppo trattato è stata somministrata la stessa dieta di finissaggio con l'aggiunta di 4 Kg/ton di Formyl®.
L'azienda si è impegnata a non eseguire trattamenti di massa con antibiotici durante il trattamento. In caso di terapia per via iniettiva gli animali trattati sono stati marcati ed esclusi dalla prova.
Sono state incluse nello studio 3 partite successive di trattati e di controlli che venivano inviate a macellazione settimanalmente. Di conseguenza i suini del gruppo trattato hanno assunto la dieta sperimentale per un periodo minimo di 30 e massimo di 50 giorni. Il trasporto dall'allevamento al macello è stato sempre inferiore alle 2 ore di viaggio e la sosta pre-macellazione sempre compresa fra 1 e 4 ore.
Per ogni ciclo di macellazione è stato previsto il campionamento di 30-35 suini macellati da ciascuno dei quali è stato prelevato il contenuto ciecale ed i linfonodi mesenterici facendo attenzione ad identificare i campioni delle due matrici prelevati dallo stesso animale. Complessivamente sono stati analizzati 100 campioni nel gruppo controllo e 104 campioni nel gruppo trattato. I prelievi sono stati inviati al laboratorio in contenitori refrigerati nell'arco di 2 ore dalla macellazione.

Metodiche
I test sierologici preliminari, volti a valutare il livello di siero-prevalenza sui campioni di siero prelevati da 30 scrofe e dai 21 suini grassi sono stati eseguiti utilizzando il kit Swine Salmonella Antibody Test (IDEXX) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Sono stati considerati positivi i campioni con S/P ratio ≥ 0,25.
Per ciascun animale campionato 10 grammi di linfonodi (previa disinfezione superficiale) e 25 grammi di contenuto ciecale sono stati testati per ricerca *Salmonella spp.* secondo la metodica ISO 6579: 2002/AMD1:2007.
I ceppi di Salmonella isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione presso il laboratorio di batteriologia specializzata dell'IZS di Brescia. Sono stati considerati come portatori tutti i suini macellati risultati positivi almeno in uno dei due campioni (contenuto ciecale e linfonodi mesenterici) o in entrambi. Si è proceduto inoltre ad elaborare i dati considerando soltanto la contaminazione a livello di contenuto ciecale.

Analisi statistica
Le differenze tra le proporzioni osservate sono state valutate con il test X2.

RISULTATI DELLA PROVA

I dati dei test sierologici preliminari hanno evidenziato una prevalenza sul campione rispettivamente del 70% nelle scrofe e dell'86% dei suini grassi. In base a questi risultati l'allevamento è stato considerato infetto con elevata prevalenza e quindi arruolato.
I dati degli esami batteriologici ottenuti dai campioni di contenuto ciecale e linfonodi mesenterici prelevati in sede di macellazione vengono presentati qui di seguito (tabella 1 e tabella 2).

Tabella 1. Risultati esame batteriologico sui campioni di feci e linfonodi mesenterici prelevati al macello, Gruppo Controllo.

Gruppo Controllo	Feci	Linfonodi	Totale positivi
1a partita	**7/30** *(S. Typhimurium 7/30)*	**4/30** *(S. Typhimurium 4/30)*	**9/30**
2a partita	**17/35** *(S. Bredeney 1/35* *S. Derby 11/35* *S. Enterica O:4 (B) 2/35* *S. Soerenga 1/35* *S. Typhimurium 2/35)*	**0/35**	**17/35**
3a partita	**17/35** *(S. Rissen 9/35* *S. Derby 5/35* *S. Typhimurium 3/35)*	**0/35**	**17/35**
Totale	**41/100 (41,00%)**		**43/100 (43,00%)**

Tabella 2. Risultati esame batteriologico sui campioni di feci e linfonodi mesenterici prelevati al macello, Gruppo Trattati.

Gruppo Trattati	Feci	Linfonodi	Totale positivi
1° prelievo	**6/35** *(S. Panama 5/35* *S. Typhimurium 1/35)*	**1/35** *(S. Typhimurium 1/35)*	**6/35**
2° prelievo	**8/34** *(S. Brandeburg 1/34* *S. Enterica 4,12:i:- 2/34* *S. Hadar 2/34* *S. Typhimurium 3/34)*	**5/34** *(S. Enterica 4,12:i:- 2/34* *S. Rissen 1/34* *S. Typhimurium 2/34)*	**11/34**
3° prelievo	**11/35** *(S. Derby 5/35* *S. Enterica 4,12:i:- 1/35* *S. Typhimurium 5/35)*	**4/35** *(S. Derby 1/35* *S. Typhimurium 3/35)*	**13/35**
Totale	**25/104 (24,04%)**		**30/104 (28,85%)**

Per il gruppo di controllo (tabella 1) sono stati analizzati 100 campioni di feci ed altrettanti linfonodi ed i campioni positivi sono risultati essere 43, ossia il 43,00%. Nel gruppo trattato (tabella 2) invece sono stati esaminati 104 campioni, di cui 30 positivi (28,85%).

La differenza osservata tra le proporzioni di positivi nei gruppi, pari a 14,15% [IC95%: 1,11% – 27,19%], è risultata essere statisticamente significativa (test X 2, p<0,05). Il rischio relativo tra il gruppo dei controlli e il gruppo trattato è risultato pari a 1,5 (43,00/28,85).
Analizzando i dati ottenuti dalla contaminazione delle sole feci (tab. 1 e 2, prima colonna), si osserva una maggiore differenza tra i gruppi, pari a 16,96% [IC95%: 4,29% – 29,63%]. Tale differenza è determinata dalla presenza di 41 campioni positivi su 100 nel gruppo di controllo (41,00%) e di 25 campioni positivi su 104 nel gruppo trattato (24,04%).
Anche in questo caso la differenza è risultata statisticamente significativa (test X 2, p<0,01); il rischio relativo è risultato pari a 1,7 (41,00/24,04).

DISCUSSIONE

Uno dei punti chiave per ridurre la contaminazione delle carcasse da parte di *Salmonella* è assicurarsi che che la prevalenza di suini portatori sia compresa entro limiti accettabili. Diversi ricercatori hanno evidenziato che la circolazione di *Salmonella* risulta piuttosto frequente nelle fasi finali dell'allevamento del suino leggero (Berends et al., 1996; Davies et al., 1999, Funk et al., 2001, Creus et al. 2007). Dati ottenuti da Merialdi et al. (2007) e da Nigrelli et al. (2008) confermano queste osservazioni anche per quanto riguarda il suino pesante italiano ed anzi suggeriscono che proprio la maggiore durata del periodo di ingrasso potrebbe configurarsi come uno dei punti critici nel controllo dell'infezione in allevamento: interventi mirati in questa fase potrebbero essere utili per ridurre il numero di suini portatori al momento della macellazione. Nella maggior parte delle osservazioni condotte e riportate in bibliografia l'aggiunta di acidi organici alla dieta o all'acqua di bevanda per periodi prolungati a partire da diverse settimane prima della macellazione è risultata efficace nel prevenire la colonizzazione dell'intestino da parte dei batteri patogeni (Øverland et al., 2000; Jensen et al., 2003) e nel ridurre la sieroprevalenza dell'infezione da *Salmonella* (Van der Heijden et al., 2006; Van der Wolf et al.; 2001, Creus et al., 2007; Visscher et al. 2008). Altri Autori (De Busser et al., 2007; De Busser et al., 2008), utilizzando acidificanti per periodi più brevi non hanno invece ottenuto risultati incoraggianti. In questo studio, con una somministrazione della durata di almeno 30 giorni, sono state osservate differenze statisticamente significative tra i dati ottenuti dai campioni fecali e linfonodali prelevati dal gruppo controllo e da quello trattato. Una maggiore riduzione della prevalenza è stata successivamente rilevata considerando soltanto i risultati sui contenuti ciecali, dove si è passati da una positività del 41% nel gruppo controllo, ad una del 24% in quello trattato e questo fatto potrebbe essere riconducibile ad un effetto più marcato del prodotto all'interno del lume intestinale che non a livello linfonodale.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questa prova di campo hanno messo in evidenza che l'aggiunta di acidificanti protetti (Formyl®) alla dieta per un periodo di almeno 30 giorni prima della macellazione può essere considerato uno strumento di valido ausilio per ridurre la

prevalenza dell'infezione da *Salmonella* spp. E' tuttavia doveroso sottolineare che per ottenere risultati ripetibili e costanti nel ridurre la prevalenza dell'infezione in allevamento non è mai sufficiente applicare una singola misura ma è invece necessario implementare una combinazione di interventi di tipo gestionale, sanitario ed alimentare. Il problema richiede quindi un intervento simultaneo su più fronti ed il modo migliore per il Veterinario di approcciarsi ad esso è sicuramente quello di elaborare strategie adeguate a partire dall' individuazione di tutti i punti critici presenti in allevamento, così da avere bene chiara la tipologia aziendale con la quale ha a che fare e la sua situazione epidemiologica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i colleghi Giovanni Vecchi, Giorgio Cuoghi, Oliviero Bossoli ed Eros Moscardini per il supporto logistico e tutto il personale tecnico della Sezione IZSLER di Bologna per l'insostituibile contributo tecnico.

Bibliografia

Anonimo (May, 2008) "Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 20006-2007. Part A. The EFSA Journal 135, 1-111.

Anonimo (November, 2008) "Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, in the EU, 20006-2007. Part B. The EFSA Journal 206, 1-111

Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. van Knapen (1996) "Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella spp*. in pigs". Int. J. Food Microbiol. 30, 37–53.

Creus E., Pérez J.F., Peralta B., Baucells F., Mateu E. (2007) "Effect of Acidified feed on the prevalence of Salmonella in market-age pigs". Zoonoses and Public Health 54, 314-319.

Davies, P. R., J. A. Funk, and W. E. M. Morrow (1999) "Fecal shedding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina". Swine Health Prod. 7, 231–234.

De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2008) "Effect of the use of organic acids in drinking water during the last two weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding". In: 7th International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, 9-11 May 2007, 280-282.

De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2007) "Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses". Zoonoses and Public Health, 1-7.

De Busser E.V., Dewulf J., Nollet N., Houf K., Schwarzer K., De Sadeleer L., De Zutter L., Maes D. (2008) "Effect of the use of organic acids in drinking water before slaughter on *Salmonella* shedding". In: Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, 178.

Funk, J. A., P. R. Davies, and M. A. Nichols, 2001) "Longitudinal study of *Salmonella*

enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems". Vet. Microbiol. 83, 45–60.
Jensen, B. B., O. Hojberg, L. L. Mikkelsen, S. Hedeman,, N. Canibe, (2003) "Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease". In: Ronald O. Ball: (ed.), Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Phisiology in Pigs, AB, Canada, pp. 103–119. University of Alberta, Banff, AB, Canada.
Merialdi G., Tittarelli C., Bonilauri P., Dottori M., Bonci M., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Granito G., Guerzoni S. (2007) "Studio longitudinale dell'infezione da Salmonella in quattro allevamenti a ciclo chiuso del Nord Italia". In: XXXIII Meeting Annuale SIPAS, Modena, Marzo 2007, 445-455.
Nigrelli A.D., Alborali L., Boldini M., Fabbri M., Vezzoli F. (2008) "prevalenza dell'infezione da Salmonella enterica in allevamenti del Nord Italia: modello di distribuzione in fasce a differente prevalenza". In: XXXIV Meeting Annuale SIPAS, Salsomaggiore Terme, Marzo 2008, 195-200.
Øverland M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M. (2000) "Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs". J. Anim. Sci. 78, 1875-1884.
Van der Heijden H.M.J.F., Ederveen W., Niewerth D., Frankena K. (2006) "Effectiveness and profitability of different *Salmonella* control programmes in a large field trial". The Pig J., 58, 182-189.
Van der Wolf P.J., van Shie F.W., Elbers A.R.W., Engel B., van der Heijden H.M.J.F., Hunnemann W.A., Tielen M.J.M. (2001) "Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections". Vet. Quart. 23, 121-125.
Visscher C.F., Winter P., Verspohl J., Stratmann-Selke J., Upmann M., Beyerbach M., Kamphues J. (2008) "Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of Salmonella in fattening pigs on farm and at slaughter". J. of Anim. Phys. and Anim. Nutrit. 1-8.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' IN CONDIZIONI DI CAMPO DI DUE MEDICAZIONI IN ALIMENTO A BASE DI AMMINOSIDINA E APRAMICINA SULLA DIARREA DA E. COLI (E. COLI ENTEROTOSSICI) DOPO LO SVEZZAMENTO

EFFECT EVALUATION OF AMMINOSIDINE AND APRAMYCIN IN FEED TREATMENT IN POST WEANING ETEC DIARRHOEA

NIGRELLI A.D.°, VANTINI F.°°, CAMONI C.,°°°, CASAPPA P.°°°.

° Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia,Sezione Diagnostica di Mantova
°°Veterinario LP,Verona
°°° CEVA VETEM,Agrate Brianza (MI)

Parole chiave. Amminosidina, Apramicina, E.coli, Diarrea, suini

Key words. Aminosidine, Apramycin, E.coli, Diarrhoea, Pig

Riassunto.È stata valutata l'efficacia di un trattamento nell'alimento a base di Amminosidina nel controllo della diarrea post-svezzamento dei suinetti. Gli autori hanno verificato una migliore risposta dei soggetti così trattati a confronto di soggetti sottoposti a trattamento con Apramicina.

Summary. The efficacy of an in feed treatment, Amminosidine based, in controlling post-weaning diarrhoea was evaluated. The authors verified the better results of treated piglets in comparison to the ones in feed treated with Apramycin.

INTRODUZIONE

Gli antibiotici appartenenti alla famiglia degli aminoglicosidici sono da tempo noti per la loro attività battericida nei confronti dei batteri aerobi Gram negativi. (Beretta C.,Carli S.1986).
Tra gli appartenenti a questa famiglia, Amminosidina si caratterizza per un ampio spettro di attività antibatterica, per una scarso assorbimento a seguito di somministrazione orale cui segue una eliminazione per via fecale. Grazie a queste caratteristiche essa è stata utilizzata in particolare in caso di infezioni del tratto intestinale che colpiscono, in particolare, gli animali giovani nel periodo post-svezzamento.
Il tratto intestinale dei suini svezzati è infatti spesso il bersaglio di diverse popolazioni microbiche, patogene e non patogene tra le quali gli *E. coli* hanno un ruolo di grande importanza.
In particolare i ceppi patogeni di *E. coli* possono essere divisi in una varietà di patotipi: i principali tra questi si ritiene abbiano un ruolo importante nello sviluppo di forme diarroiche che colpiscono la specie suina: la loro classificazione identifica patotitpi ente-

rotossigeni (ETEC), verotossigeni (VTEC) ed attaching effacing *E. coli* (AEEC).
Gli stipiti patogeni di *E. coli* causano la malattia colonizzando il tratto gastroenterico del suino.
Poiché i coliformi sono frequentemente presenti nelle feci, le misure igieniche sanitarie sono una importante misura per il loro controllo. Altre tecniche manageriali, come il tutto pieno/tutto vuoto, possono contribuire a prevenire, ad esempio, la trasmissione verticale di E. coli. (Benassi et al. 1986) (Monti 1986).
Tra i mezzi più spesso utilizzati per controllare le infezioni da *E. coli* nel suino, la terapia antibiotica ha un valore importante; in particolare nel presente studio si è valutata l'efficacia di una medicazione in alimento a base di Amminosidina, per controllare le diarree da *E. Coli* enterotossici. Scopo dello studio è stato valutare non solo l'effetto migliorativo sulle performance dei soggetti trattati ma anche l'importanza che questi programmi di medicazione vengano forniti sulla base di "strategie" che consentano, ove possibile e sulla scorta di una corretta raccolta di dati anamnestici relativi allo storico aziendale, di ottimizzare l'uso delle molecole ad azione antibatterica attraverso una programmazione del loro utilizzo. (Casappa et al. 2007).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito in un allevamento di suini a ciclo chiuso con una popolazione di circa 500 scrofe del Nord Italia. La prova si è svolta in una struttura che all'indagine anamnestica remota e prossima denunciava la comparsa ricorrente di episodi ascrivibili a diarrea post-svezzamento da *E. coli* (Enterite colibacillare post-svezzamento). I mangimi utilizzati nel corso del presente studio sono stati prodotti da un mangimificio autorizzato

Animali e trattamento
Il disegno sperimentale ha coinvolto 220 suini di ambo i sessi di razza Large White x Landrace, nella fase post-svezzamento.
I soggetti di peso variabile tra i 7 e i 10 kg di peso vivo sono stati suddivisi in due gruppi da 110 soggetti ciascuno
GRUPPO A: Trattato con premiscela medicamentosa a base di Amminosidina (GABBROCOL® 200) in alimento per 5 giorni alla dose giornaliera di 500 grammi per quintale di alimento, posologia prevista dalla registrazione del prodotto in regime terapeutico (pari a 40 mg di Amminosidina per kg. di p.v.).
GRUPPO B: trattato con premiscela medicamentosa a base di Apramicina (Apralan® G 200 Premix) in alimento per 7 giorni alla dose giornaliera di 100 grammi per quintale di alimento, posologia prevista dalla registrazione del prodotto in regime terapeutico (pari a 8 mg di Apramicina per kg di p.v.).
Il trattamento iniziava alla comparsa dei primi sintomi di diarrea.
Non è stato utilizzato un gruppo di controllo in bianco non trattato, in quanto per la salvaguardia del benessere animale non è eticamente corretto non trattare animali in presenza di forme patologiche anche gravi.
I suini sono stati accasati in box identificati, nel rispetto delle suddette norme sul benessere animale ed in numero adeguato alla superficie dei box.
Inoltre 11 soggetti per ciascuno dei due gruppi, due soggetti per ogni box, scelti ed accasati nei box in modo randomizzato, venivano identificati singolarmente: il peso medio dei 11

soggetti del gruppo A era di 8,94 ± 1,05 kg, mentre il peso medio dei 11 soggetti appartenenti al gruppo B era di 9,20 ± 0,96 kg .
Inoltre, al fine di valutare gli effetti dei trattamenti sul peso vivo, le pesate dei 22 soggetti erano ripetute alla fine del trattamento ed alla fine del periodo di osservazione, cioè 5 giorni dopo la fine del trattamento per il gruppo A e 3 giorni dopo la fine del trattamento per il gruppo B.

Osservazioni cliniche e rilievi zootecnici
Sui soggetti coinvolti nel presente disegno sperimentale sono state valutate le frequenze dei casi di diarrea da E. Coli, il numero di trattamenti parenterali per terapia di enteriti e la mortalità dovuta a Colienterotossicosi e Colienterotossiemia per tutta la durata dei periodi di trattamento e per il successivo periodo di osservazione. Gli animali che presentavano patologie diverse da quelle oggetto del presente studio sono stati esclusi dal proseguimento della prova e sottoposti a specifico trattamento per la patologia manifestata. Tutte le osservazioni relative alla efficienza dei trattamenti venivano registrate giornalmente nelle apposite schede cliniche. I dati osservati sono stati registrati al momento dell'osservazione.

Analisi e Valutazioni statistiche
L'omogeneità della popolazione sperimentale, costituita da 220 soggetti in un ristretto range di età, corrisponde ad un criterio di restrizione sperimentale, ciononostante verrà considerata e quindi rilevata per i successivi aggiustamenti nella analisi statistica, l'età dei soggetti all'arruolamento, potendo questa influenzare l'esito della prova. L'unità sperimentale considerata è stata l'animale identificato.
L'analisi statistica ha coinvolto 22 suini suddivisi *random* in due gruppi di trattamento omogenei per numero. Gli animali sono stati accasati, seguendo una lista di randomizzazione, nei box, identificati con caratteri alfanumerici..
Alla comparsa dei primi sintomi clinici i due gruppi hanno iniziato il trattamento (giorno 0) e sono stati pesati 11 animali per ogni gruppo di trattamento, prendendo 11 come numero rappresentativo del totale dei soggetti in ciascun gruppo di trattamento.
Al test "t" per dati indipendenti, l'omogeneità di peso dei due gruppi trattamento non dava differenze significative (t=0,634; p=0,533). In questo caso è stata utilizzata una analisi della varianza a due vie (ANOVA) per correggere ed eliminare gli effetti del tempo sull'accrescimento: non sono state rilevate interazioni tra trattamento e periodo di pesata.
Per tutte le procedure statistiche è stata considerata una significatività pari a p=0,05.

RISULTATI

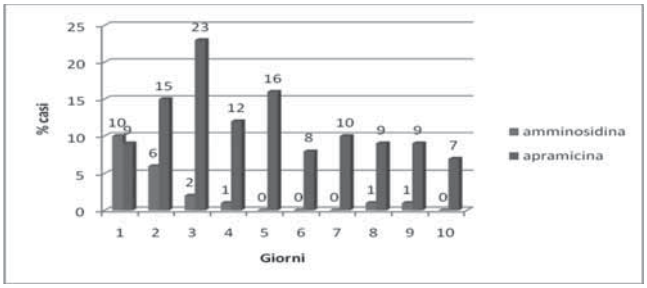
Effetti del trattamento sull'incremento ponderale
Alla fine dei rispettivi periodi trattamento le differenze in peso dei gruppi in esame non risultavano statisticamente significative: i pesi medi erano di 9,40 ± 0,87 kg e di 8,95 ± 0,94 kg, rispettivamente per il gruppo A (Amminosidina) e per il gruppo B (Apramicina). Il valore di "t" è risultato 1,17 con p=0,25.
Al termine della prova (fine periodo osservazione per entrambi i gruppi) i pesi medi per i gruppi esaminati erano 12,29 ± 1,45 kg e 11,21 ± 0,8 kg rispettivamente per gruppo A e gruppo B, con un valore di t di 2,14, corrispondente a p=0,044 (statisticamente significativo) (Tabella 1; Pesi dei soggetti). È stata applicata l' analisi di varianza a due vie (tempo-

trattamento per eliminare gli eventuali effetti del tempo sull'accrescimento). In questo caso la durata del trattamento e del periodo di osservazione non hanno avuto un effetto significativo sul peso, e non si rilevano interazioni tra trattamento e periodo di pesata.

Tabella dei pesi dei soggetti (n=11) nei tre giorni di determinazione

Periodo	Peso (kg) Gruppo A	Peso (kg) Gruppo B
Inizio trattamento	8.94±1.05	9.20±0.96
Fine trattamento	9.40±0.87	8.95±0.94
Fine follow-up	12.29±1.45	11.22±0.80*

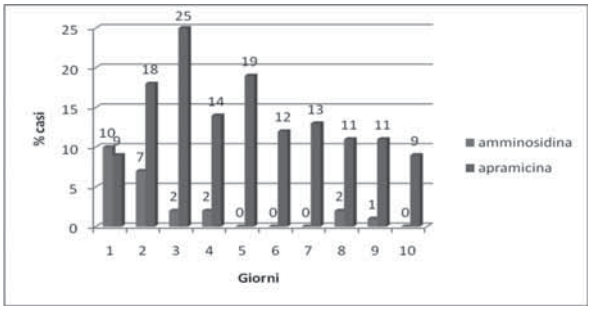
Effetti del trattamento sulle manifestazioni cliniche
Molto interessanti sono le frequenze osservate per le manifestazioni cliniche:
per l'analisi delle frequenze delle manifestazioni cliniche osservate su 110 animali per gruppo è stato applicato il test di Fisher per tabelle 2x2. Dal grafico n.1 si nota come la frequenza delle diarree da Coli siano più elevate nel gruppo trattato con apramicina.



Graf. N. 1 – Frequenze assolute dei casi di diarrea da Coli (n=110)
Una differenza con $p<0.01$ è stata osservata per tutti i giorni di osservazione escluso il giorno 2 ($p<0.05$).

Effetti del trattamento sui trattamenti per via parenterale
Le stesse osservazioni possono essere fatte per i trattamenti parenterali, le cui frequenze assolute sono riportate nel grafico 2.

Graf. N. 2 – Frequenze assolute dei trattamenti parenterali (n=110)



CONCLUSIONI

L'analisi effettuata sull'evoluzione dei pesi e degli accrescimenti degli animali, sulla frequenza degli episodi di diarrea e sul numero degli interventi per via parenterale ha evidenziato un migliore effetto della medicazione in mangime con Amminosidina rispetto alla medicazione eseguita con Apramicina. Si può notare come il gruppo A mostri un minore numero di manifestazioni cliniche associate a diarrea e che il controllo di questo fenomeno è estremamente uniforme nel gruppo tanto da evidenziare la quasi totale scomparsa di recidive anche nel periodo post-trattamento.
Sia per ciò che riguarda la sintomatologia sia per ciò che riguarda la necessità di utilizzare trattamenti per via parenterale un ulteriore dato positivo è dato dalla rapidità con la quale il trattamento utilizzato nel gruppo A riesce a controllare il fenomeno diarroico se paragonato all'andamento dello stesso parametro nel gruppo B.
Ne consegue che, poiché le differenze tra i parametri esaminati nei due gruppi di animali hanno mostrato significatività statistica, il trattamento con Amminosidina in mangime ha consentito un più rapido recupero alla produzione dei soggetti, una diminuzione della necessità di ulteriori interventi ed una più semplice gestione del fenomeno diarroico.

I rilievi statistici sono stati effettuati dal Prof. M. Faustini dell'Università di Milano.

Bibliografia:

Benassi C.,Monetti P:G.:,Montella L.,Roncone R.,Mondino G.(1986). Risultati sull'impiego dell'amminosidina nell'alimentazione dei suinetti sottoposti a svezzamento precoce .Riv.Zoot.Vet.,Vol 14,n.2,130-139

Beretta C.,Carli S.(1986).Amminosidina.Breve rassegna sulle proprietà farmacotossicologiche.Riv.Zoot.Vet.,vol 14,n.2, 75-85

Monti F. (1986) .L'amminosidina nella pratica clinica veterinaria .Riv.Zoot.Vet,vol 14,n 2,140-154.

Casappa P., Camoni C., Zanichelli C. (2007) Uso strategico della medicazione in suinicoltura; i mangimi medicati. Riv. Zoot. Vet., vol. 37, n 2, 55-65.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DUE MEDICAZIONI IN ACQUA DI BEVANDA A BASE DI AMMINOSIDINA E DI GENTAMICINA SULLA DIARREA DA ETEC (E.COLI ENTEROTOSSICI) DOPO LO SVEZZAMENTO

EFFECT EVALUATION OF THE AMINOSIDINE AND GENTAMICIN WATER MEDICATION IN POSTWEANING ETEC DIARRHOEA

NIGRELLI A.D.°, VANTINI F.°°, CAMONI C.°°°, CASAPPA P.°°°.

° Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia, Sezione Diagnostica di Mantova °°Veterinario LP,Verona °°° CEVA VETEM,Agrate Brianza (MI)

Parole chiave: Amminosidina, Gentamicina, E.coli, Diarrea, Suini

Key words: Aminosidine, Gentamicin, E.coli, Pig

Riassunto. Gli Autori hanno verificato la migliore efficacia sull'incremento ponderale e sul controllo della diarrea da E. coli dopo lo svezzamento nei suinetti di amminosidina rispetto a gentamicina.

Summary. The Authors verified the best effect on the E.coli post-weaning diarrhoea and on the growth of aminosidine in piglets, in compared with gentamicin.

INTRODUZIONE

Amminosidina è un antibiotico appartenente al gruppo degli aminoglucosidi cui afferiscono anche le ben note streptomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina e apramicina. (Beretta, Carli, RZV 1986).
Come gli altri aminoglucosidi è dotata di uno spettro di attività antibatterica molto ampio.
E' scarsamente assorbita in caso di somministrazione orale, dopo la quale viene prevalentemente eliminata con le feci. Tali caratteristiche la rendono particolarmente interessante nella terapia e metafilassi delle enteriti batteriche complicate o meno dalla presenza di protozoi (Balantidium coli, Criptosporidi, Giardia).
Infatti da tempo è riconosciuta la notevole efficacia sulle enteriti batteriche dei suini e specialmente sul controllo delle Colienterotossicosi e Colienterotossiemie dopo lo svezzamento
Scopo dello studio è quello di valutare l'efficacia di amminosidina, somministrata mediante acqua di bevanda, nel controllo delle diarree da E.coli enterotossici, dopo lo svezzamento e l'eventuale effetto migliorativo conseguente sull'efficienza alimentare. (Benassi et al. RZV 1986 Monti Rzv 1986).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito in un allevamento commerciale a ciclo chiuso del Nord Italia con anamnesi patologica di Colibacillosi post-svezzamento, confermata da un punto di vista microbiologico,con la messa in evidenza di ceppi enterotossici di E.coli.

Animali e Trattamenti.

Il disegno sperimentale ha coinvolto 400 suini di entrambi i sessi di razza large White per Landrace, nella fase post-svezzamento.
I soggetti di peso variabile tra 6 e 9 Kg. di peso vivo venivano divisi in due gruppi di 200 soggetti cadauno.

Gruppo A: trattato con Amminosidina 10% solubile mediante acqua di bevanda per 5 giorni alla dose giornaliera di 40 grammi di prodotto ogni 100 Kg., posologia prevista dalla registrazione del prodotto in regime terapeutico.(pari a 40 mg di amminosidina per kp p.v.)
Gruppo B: trattato con Ganaben S.P. solubile mediante acqua di bevanda per 5 giorni alla dose giornaliera di 2 grammi ogni 100 di p.v., posologia prevista della registrazione del prodotto in regime terapeutico. (pari a 4 mg di gentamicina per di kg p.v.)
Il trattamento iniziava alla comparsa dei primi sintomi di diarrea.
Non è stato utilizzato un gruppo di controllo in bianco non trattato, in quanto per la salvaguardia del benessere animale non è eticamente corretto lasciare animali con patologie gravi senza trattamenti.
I suini erano accasati nei box identificati, nel rispetto delle norme sul benessere animale ed in u numero adeguato alla superficie dei box stessi.
Inoltre 30 soggetti per ciascuno dei due gruppi, due soggetti per ogni box, scelti ed accasati nei box in modo randomizzato, venivano identificati singolarmente: il peso medio dei 30 soggetti del gruppo A era di 7,84+ 1,64 Kg., mentre il peso medio dei 30 soggetti appartenenti al gruppo B era di 7,27 + 1,46 Kg.
Inoltre, al fine di valutare gli effetti dei trattamenti sul peso vivo le pesate, dei 60 soggetti erano ripetute alla fine del trattamento e alla fine del periodo di osservazione, cioè 5 giorni dopo la fine del trattamento.

OSSERVAZIONI CLINICHE E RILIEVI ZOOTECNICI

Sul totale dei soggetti coinvolti nella sperimentazione, sono state valutate le frequenze dei casi di diarrea da E. coli, il numero dei trattamenti parenterali per terapia delle enteriti e la mortalità specifica da Colienterotossicosi e Colienterotossiemia per tutta la durata del trattamento e per i 5 giorni successivi di osservazione. Gli animali che presentavano patologie diverse da quelle oggetto dello studio non proseguivano la prova e venivano trattati in modo specifico per la patologia manifestata.
Tutte le osservazioni giornaliere relative all'efficienza venivano registrate giornalmente nelle schede cliniche .

ANALISI E VALUTAZIONI STATISTICHE

L'omogeneità della popolazione sperimentale, costituita da 400 soggetti collocati in un ristretto range di età-peso,corrisponde ad un criterio di restrizione sperimentale ,ciononostante è stata considerata ,per i successivi aggiustamenti in sede di analisi statistica l'età dei soggetti all'arruolamento,potendo ,questa,influenzare l'esito della prova ;la valutazione degli esiti è stata fatta in ossequio al principio dell'"intention to treat".

La significatività delle differenze di incidenza di diarrea da E. coli e dei trattamenti parenterali nei due gruppi è stata valutata mediante test esatto di Fisher.
L'omogeneità iniziale del peso medio dei 60 soggetti (30 per gruppo) pesati ed identificati singolarmente è stata valutata con test t per dati indipendenti :la differenza è risultata non significativa (t=1,42;p=0,16). Inoltre, con lo scopo di correggere, per l'effetto del tempo sull'accrescimento, le differenze tra trattamenti per il periodo considerato ,queste sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA) a due criteri di classificazione (trattamento, periodo e interazione (trattamento, periodo e interazione trattamento per periodo)

L'effetto dei trattamenti sull'accrescimento ponderale nei 10 giorni della prova è stato valutato con test t per campioni indipendenti.
Per tutte le procedure statistiche è stata considerata una significatività pari a p=0,05

RISULTATI

Effetti del trattamento sull'incremento ponderale.
Al quinto giorno, in concomitanza con la prima pesata dall'inizio del trattamento ,le differenze di peso tra i gruppi in esame non risultavano statisticamente significative: i pesi medi erano di 8,84+1,93 kg e di 8,17+1,60 kg ,rispettivamente per il gruppo A (AMINO) e per il gruppo B (GENTA).
Il valore di t è risultato 1,46 con p=0,147.
Al termine della prova (decimo giorno) i pesi per i gruppi erano di 10,92+2,20 kg e di 9,67+1,78 kg ,rispettivamente per il gruppo A e per il gruppo B. Il t-test ha restituito un responso di significatività (t=2,42;p=0,018).
Il grafico degli andamenti ponderali per i due gruppi di trattamento è riportato in Figura 1.L'accrescimento ponderale nei dieci giorni presi in esame presenta differenze significative nei due gruppi :i suini del gruppo A hanno avuto un incremento medio complessivo di 3,05+0,74 kg e quelli del gruppo B di 2,43+0,65 (t=3,46 ; p=0,0010).
L'effetto del trattamento aggiustato per il periodo mostra come vi sia ,per tutta la durata dello studio, un effetto positivo della somministrazione di amminosidina (Tabella 1). Non sono stati rilevati effetti tra i due fattori.

Tabella 1. Riepilogo ANOVA per gli effetti trattamento, periodo e loro interazione.

Sorgente	Somma dei quadrati	Gl	Media dei quadrati	F	Sig.
Modello corretto	267,340(a)	5	53,468	16,784	0,000
Intercetta	13893,478	1	13893,478	4361,273	0,000
Trattamento	31,084	1	31,084	9,757	0,002
Periodo	232,228	2	116,114	36,449	0,000
Tratt * Periodo	4,028	2	2,014	,632	0,533
Errore	554,303	174	3,186		
Totale	14715,120	180			
Totale corretto	821,642	179			

Le medie marginali attese per i due gruppi di trattamento inseriti nel modello sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2 . Medie marginali attese per i gruppi di trattamento

Tratt	Media Kg	Errore std.	Inter. Conf. 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore	Limite inferiore	Limite superiore
AMINO	9,201	0,188	8,830	9,572
GENTA	8,370	0,188	7,999	8,741

Analisi delle frequenze dei soggetti colpiti da diarrea e sottoposti a trattamento parenterale.

I dati di seguito riportati, si riferiscono al numero totale dei soggetti presi in considerazione (circa 200 per il gruppo A e circa 200 per il gruppo B .L'andamento delle percentuali riferite ai casi di animali colpiti da diarrea da ETEC (E.coli enterotossici) e di quelli che sono stati sottoposti al trattamento parenterale ,sono riportati nelle Figure 1 e 2.

Dalla disamina dei tracciati, in entrambi i grafici, si evidenzia come il gruppo trattato con amminosidina abbia mostrato una minore incidenza in casi di diarrea da E.coli ed una minore propensione al trattamento parenterale .In particolar modo ,il test di Fisher ,ha rilevato una significatività statistica tra gruppi nei giorni 2 e 3 ,per quanto riguarda i soggetti colpiti da diarrea e nel giorno 2 di sperimentazione nei soggetti sottoposti a trattamento parenterale .

E' interessante osservare come nei giorni di follow up il gruppo B mostri un'ipotetica tendenza alla recidiva ,non osservata nel gruppo A.

In entrambi i gruppi non è stata rilevata alcuna mortalità specifica da E.coli .

Fig. 1: andamento giornaliero dei casi di animali con diarrea da Coli.

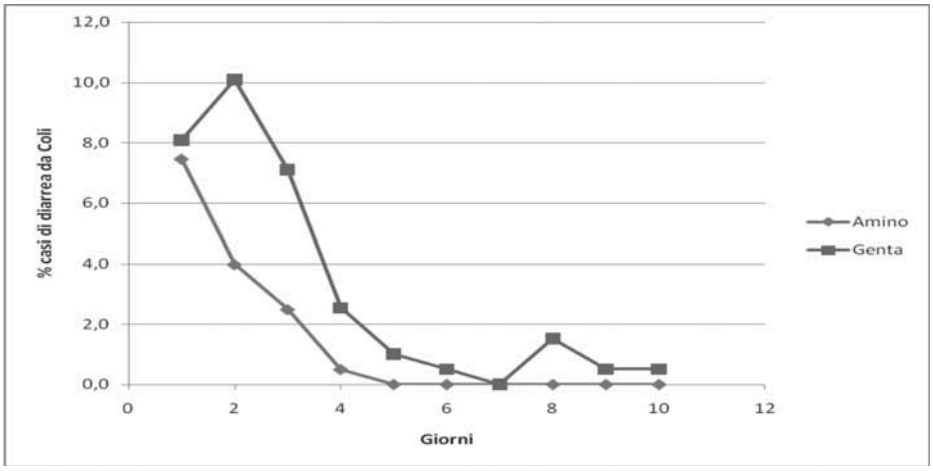


Figura 2: andamento giornaliero dei casi di animali sottoposti a trattamento parenterale

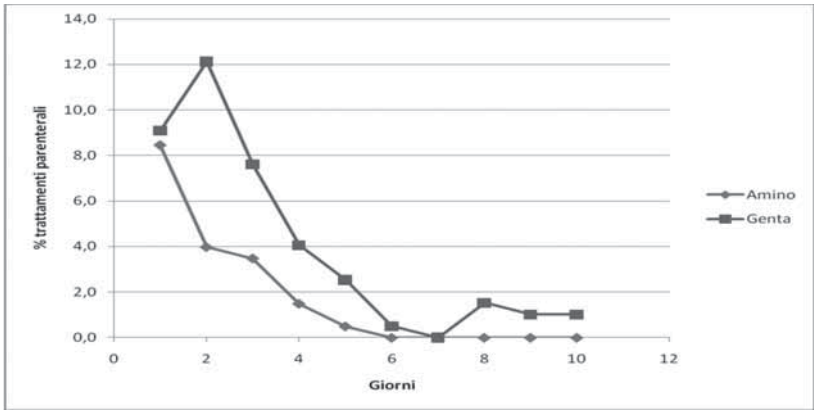
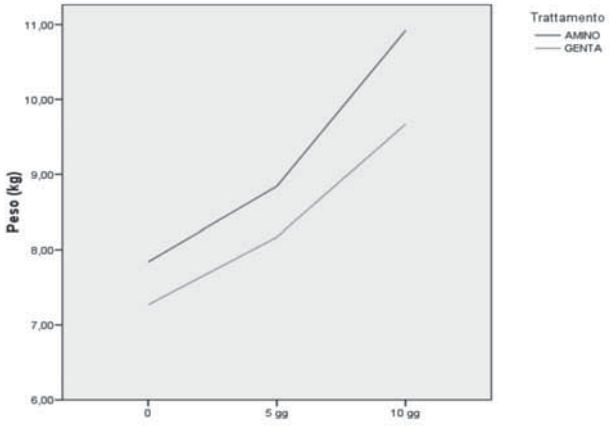


Figura 3: Andamenti ponderali medi per i due gruppi di trattamento.



CONCLUSIONI

L'analisi dei dati relativi ai pesi vivi ,agli accrescimenti ,alla comparsa di episodi di diarrea ,nonché alla frequenza di interventi parenterali ha consentito di evidenziare un migliore effetto del trattamento con amminosidina rispetto a quanto osservato in animali trattati con gentamicina

In particolare ,si nota come l'andamento dei casi di diarrea da E. coli nel gruppo trattato con amminosidina sia significativamente differente sin dall'inizio del trattamento, con un calo repentino,inoltre, a differenza del gruppo trattato con gentamicina, non mostra tendenza a recidivare nel follow up post-trattamento. Le medesime conclusioni si possono trarre per quanto concerne la frequenza di interventi parenterali.

I pesi vivi e gli incrementi ponderali dei 30 soggetti campionati in ogni gruppo ,dal totale dei suini considerati nella presente sperimentazione ,mostrano valori statisticamente significativi maggiori nel gruppo trattato con amminosidina rispetto al gruppo trattato con gentamicina.
Si può ipotizzare che il migliore effetto antibiotico espletato dalla amminosidina possa favorire positivamente gli incrementi per un repentino miglioramento dello stato di salute già dai primi giorni di trattamento.

I rilievi statistici sono stati effettuati dal Prof. M. Faustini dell'Università di Milano.

Bibliografia:

Benassi C.,Monetti P:G.:,Montella L.,Roncone R.,Mondino G.(1986).Risultati sull'impiego dell'amminosidina nell'alimentazione dei suinetti sottoposti a svezzamento precoce .Riv.Zoot.Vet.,Vol 14,n.2,130-139

Beretta C.,Carli S.(1986).Amminosidina.Breve rassegna sulle proprietà farmacotossicologiche.Riv.Zoot.Vet.,vol 14,n.2, 75-85

Monti F. (1986) .L'amminosidina nella pratica clinica veterinaria .Riv.Zoot.Vet,vol 14,n 2,140-154.

CYSTICERCUS TENUICOLLIS IN SUINI MACELLATI NORMALMENTE.

CYSTICERCUS TENUICOLLIS IN REGULARLY SLAUGHTERED PIGS.

PERRONE V.*, BUSI M., INGROSSO S.**, CITO G.*, D'AMELIO S.****

** Az. USL Roma B, Servizio Veterinario, Dip. di Prevenzione, V.le Palmiro Togliatti, 1280 - 00155 Roma*
***Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Sezione di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza", P.le Aldo Moro, 5 - 00185 Roma*

Parole chiave: suino, macellazione, Cysticercus tenuicollis

Key words: pig, slaughtering, Cysticercus tenuicollis

Riassunto. *Cysticercus tenuicollis*, forma larvale di *Taenia hydatigena*, è frequente nei ruminanti (domestici e selvatici), più rara nei suini e bovini.
Si riportano i dati raccolti in un macello industriale dal 2000 al 2008 sulla presenza di C. *tenuicollis* all'ispezione post-mortem in suini.
Dal presente studio il fegato, diversamente da quanto finora riportato, non risulta essere l'organo più colpito da *C. tenuicollis*; infatti negli ultimi quattro anni (2005-2008) viene riscontrato a livello pleuro-polmonare, polmonare e cardiaco.

Abstract. *Cysticercus tenuicollis* is the larval stage of *Taenia hydatigena* and infects mainly ruminants (domestic and wild) rarely pigs and cattle.
It's related the occurence of *C. tenuicollis* at the pigs post-mortem inspection in an industrial slaughterhouse between the years 2000-2008.
The liver is not the elective organ for *C. tenuicollis*, in fact in the last four years (2005-2008) is mainly found at pleuro-pulmonary, pulmonary and cardiac level.

INTRODUZIONE

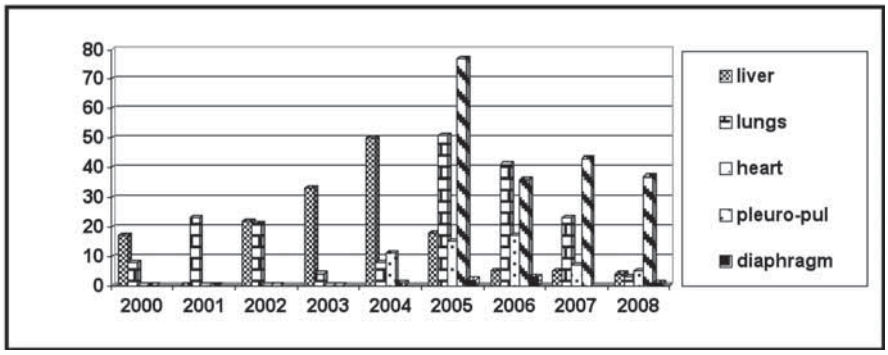
Cysticercus tenuicollis rappresenta la forma larvale di *Taenia hydatigena* (reperibile allo stadio adulto in cane, gatto, volpe) la cui infestazione è frequente nei ruminanti sia domestici (ovini, caprini) sia selvatici, più rara nei suini e nei bovini.
L'infestazione dell'ospite intermedio si verifica per ingestione delle uova disseminate nell'ambiente con le feci dell'ospite definitivo. Una volta giunte nell'intestino queste schiudono e da qui le oncosfere per via ematica migrano verso il fegato dove, trasformatesi in cisticerchi, raggiungono la glissoniana e quindi il peritoneo, loro sede definitiva (Pampiglione *et al,* 1999).
La moderna suinicoltura a carattere intensivo ha determinato profonde trasformazioni nell'allevamento: la notevole concentrazione della popolazione suina all'interno di grandi impianti zootecnici, unitamente all'impiego di moderne tecnologie, ha di fatto trasformato

il suino domestico in una "macchina" per la produzione di carne.
Un altro aspetto di notevole importanza è risultato la consistente modificazione della patologia tipica della specie suina con particolare riferimento alle malattie parassitarie; infatti anche se la scomparsa degli ospiti intermedi e la ridotta capacità dell'ambiente a supportare lo sviluppo di larve infestanti lasciano di fatto ad *Ascaris suum* ed *Isospora suis* la quasi totalità delle attuali segnalazioni di parassitosi (Poglayen et al, 2008), tuttavia non mancano rilievi di altri parassiti tra cui *C. tenuicollis* (Razzini et al, 2007; Busi *et al*, 2008).

MATERIALI E METODI

I dati dello studio riportano, in un periodo compreso tra il 2000 ed il 2008, la presenza di *C. tenuicollis* su 1.100.000 suini macellati normalmente in un macello industriale di Roma.
Il primo tipo di analisi messa in atto è stata l'ispezione morfologica *post-mortem* dei suini direttamente al macello e di quelli parassitati è stata annotata la provenienza per la successiva segnalazione. Il campione parassitologico è stato quindi prelevato e conservato in etanolo al 70% per la successiva analisi molecolare, effettuata per caratterizzare inequivocabilmente la specie parassita. Questo ulteriore esame ha previsto l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione (PCR) e sequenziamento del gene mitocondriale ribosomale *rrnS* (von Nickisch-Rosenegk M et al, 1999). Questo gene è stato scelto come marcatore molecolare poiché comunemente usato nella caratterizzazione delle diverse specie di cestodi e più in particolare nell'identificazione dei differenti ceppi (*strains*) di *Echinococcus granulosus* (Busi *et al,* 2007).

Tabella 1: Incidenza di Cysticercus nei diversi organi dei 661 suini infestati.
Table 1: Incidence of Cysticercus in different organs of the 661 infected pigs.



RISULTATI

L'ispezione *post-mortem* ha rilevato la presenza di *C. tenuicollis* in 661 suini. Il parassita si presentava con una morfologia classica: cisti di varia grandezza a forma di fiasco con un collo lungo e sottile la cui parete è costituita da una membrana sottile e contenente un liquido limpido di colore bianco-rosato (Figg 1, 2).
Tutte le sequenze analizzate hanno mostrato una completa identità (100%) con una sequenza di *T. hydatigena* presente in GenBank con numero di riferimento AB031352.
I dati (Tabella 1) evidenziano una minore incidenza a livello epatico di *C. tenuicollis*, a differenza di quanto finora riportato (Casarosa, 1985; Pampiglione *et al,* 1999); in particolare dal 2005 al 2008 le cisti sono state reperite prevalentemente a livello pleuro-polmonare, polmonare e pericardico.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il macello svolge un ruolo fondamentale come osservatorio epidemiologico (Traldi *et al,* 1993): la presenza o meno di parassiti può a ragione essere utilizzata come indicatore del livello igienico-sanitario degli allevamenti di provenienza e la comunicazione dei rilievi ispettivi della visita *post-mortem* alle aziende (allevatori e veterinari) utile per evidenziare e risolvere problemi legati alla biosicurezza degli impianti d'allevamento.
La presenza di *C. tenuicollis* è risultata notevolmente ridotta a livello epatico e fa quindi ritenere buona l'efficacia dei trattamenti antiparassitari a livello del tessuto epatico in grado di neutralizzare i parassiti ivi presenti al momento del trattamento e comunque non in grado di impedire ad alcuni cisticerchi di localizzarsi a livello di strutture pleuriche sinora descritte come inconsuete.
Tale rilievo risulta comunque in contrasto con quanto rilevato all'ispezione *post-mortem* in suini allevati per uso familiare in cui viene costantemente reperito a livello di fegato e/o peritoneo (Platini M., 2008; Calderini *et al,* 2008).

Bibliografia

1. Pampiglione, Canestri Trotti (1999) "Guida allo studio della Parassitologia", 3ª ed., Bologna, Società Editrice Esculapio.
2. Casarosa L. (1985) "Parassitologia degli animali domestici", 3ª ed., Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
3. Poglayen G., Marchesi B. (2008) "Nuovo assetto ezio-epidemiologico dei parassiti nel moderno allevamento del suino". In: "Le parassitosi del suino in allevamento: diagnosi e controllo", 1° Congresso Europeo SIVAR, Verona, 8 febbraio 2008, 39-41.
4. Calderini P., Grifoni G., Gabrielli S., Petouchoff T., Iori A., Cancrini G. (2008) "Molecular and morphological characterization of metacestodes found in pigs bred in the Rieti Province (Central Italy)", XXV Congresso Nazionale Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008, 239.
5. Busi M., Perrone V., Ingrosso S., D'Amelio S. (2008) "*Pleuro-pulmonary* and cardiac infections of *Cysticercus tenuicollis* in slaughtered pigs", XXV Congresso Nazionale Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008, 170.
6. Traldi G., Zaghini L., Capua C. (1993) "Infestazione da larve di cestodi nell'allevamento intensivo del suino". Praxis Vet. 14, 17-19.
7. Platini M. (2008) "Macellazione a domicilio: esperienza pratica nella ASL di Vercelli". Argomenti 2, 70-73.
8. Busi M., Snabel V., Varcasia A., Garippa G., Perrone V., De Liberato C., D'Amelio S (2007) "Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing". Vet. Parasitol., 30; 150 (1-2): 75-83
9. von Nickisch-Rosenegk M., Silva-Gonzalez R., Lucius R. (1999) "Modification of universal 12S rDNA primers for specific amplification of contaminated *Taenia* spp. (Cestoda) gDNA enabling phylogenetic studies". Parasitol. Res. 85, 819-825.

LINFOSARCOMA MULTICENTRICO IN UN SUINO

MULTICENTRIC LYMPHOMA IN A PIG

PERRONE V.[1], CITO. G. [1], COCUMELLI C. [2],

[1] ***Azienda U.S.L. RM B,***
[2] ***Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana***

Parole chiave: Linfoma, Suino, Linfoma multicentrico, Linfoma di Burkitt

Keywords: Lymphoma, multicentric lymphoma, pig, Burkitts lymphoma

Riassunto. Il caso riportato si riferisce ad un suino regolarmente macellato di 9 mesi di età. La visita ante-mortem non rilevava evidenti segni clinici di malattia. Alla visita post-mortem veniva evidenziato aumento di volume di fegato e milza, linfoadenomegalia generalizzata e lesioni renali, polmonari e cardiache con aspetto variegato da infiltrazione bianco-giallastra omogenea ed aspetto lardaceo al taglio. La natura delle lesioni e la loro distribuzione ha fatto sospettare la presenza di una lesione neoplastica di origine linfoide. L'esame istologico ha permesso di confermare la diagnosi, classificando la lesione come linfoma multicentrico tipo Burkitt a piccole cellule non incise ad alto grado di malignità.

Abstract. The present case regards a regularly slaughtered 9 months-old pig. No clinical signs were recorded during ante-morte examination. Post-mortem examination showed enlarged liver and spleen, generalized lymphoadenopathy and renal, pulmonary and cardiac lesions with homogeneous, yellowish-white lardaceous appearance. Considering the distribution and the appearance of the lesions, a lymphoid neoplasm has been suspected. Histopathology examination allowed to diagnose a multicentric high grade small noncleaved lymphoma Burkitt type.

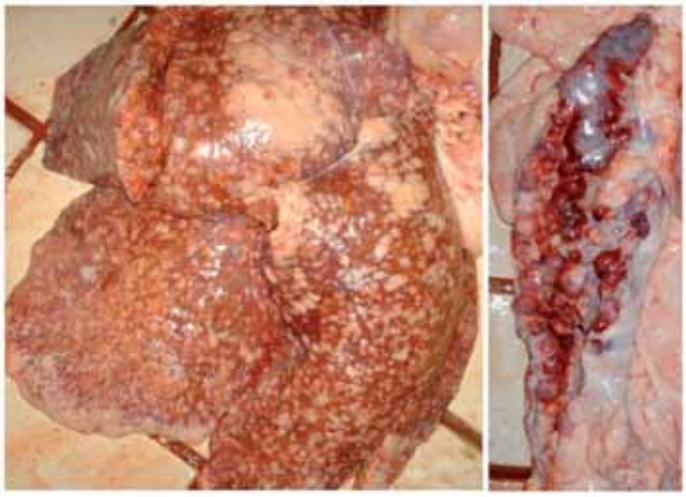
INTRODUZIONE

Il linfoma suino è una patologia poco frequente in medicina veterinaria, e si stima che abbia una incidenza variabile da 20 a 65 casi su milione nei diversi Paesi; in Italia l'ultimo dato di prevalenza riporta una valore di 25 casi su milione, mentre rappresenta la forma tumorale di più frequente riscontro nei suini al macello (Eleni *et al.,* 1993). A seguito della prima descrizione, nel 1865 da Leisering (citato da Head *et al.,* 1974), si sono susseguite diverse segnalazioni, anche se nella maggior parte dei casi con andamento sporadico e senza il riscontro di correlazioni epidemiologiche, e molte di queste non sono recenti. Esistono alcune segnalazioni di linfoma ereditario, in cui nella discendenza dei riproduttori colpiti l'incidenza del tumore ha raggiunto circa il 25% (McTaggart *et al.* 1979).
Considerando la diffusione anatomica del linfoma, è possibile distinguere la forma multicentrica, di gran lunga la più frequente (circa il 60% dei casi), la forma digerente, timica e cutanea. La classificazione istocitologica invece è ancora oggetto di studio, e varia in base alle specie animali considerate; nel presente lavoro si è seguita la classificazione umana NCIWF (National Cancer Institute Working Formulation), che identifica i linfomi in base all'aspetto

istomorfologico e classificandoli in basso, medio ed alto grado.
La linfoadenomegalia è un riscontro costante in tutte le forme, e può comportare aumento di volume dei linfonodi fino a 20-30 volte rispetto al normale; nella forma multicentrica è affiancata da un interessamento costante di fegato, milza, reni, surrenali e polmone, ed a volte si può osservare coinvolgimento delle sierose. Nella forma timica sono colpiti i linfonodi mediastinici ed il timo, mentre nella forma digerente le lesioni ai linfonodi mesenterici si accompagnano a lesioni neoplastiche del tratto gastroenterico. La rara forma cutanea è stata descritta con lesioni nodulari sessili nella regione del collo (*Marcato, 2002)*.
Nonostante le gravi alterazioni organiche di tipo infiltrativo e degenerativo che colpiscono primariamente i linfonodi, ma anche gli organi coinvolti, nella maggior parte dei casi non si osserva alcun sintomo clinico; raramente sono stati descritti sintomi aspecifici legati a fenomeni ostruttivi, la disoressia che insorge precocemente, depressione, dispnea, tachicardia ed alterazioni nella defecazione; col progredire della malattia possono evidenziarsi lesioni emorragiche ed edemi, associati ad alterazioni derivanti dall'ipofunzionalità degli organi colpiti.
Il caso oggetto di questo lavoro descrive il ritrovamento in un giovane suino al macello di un linfoma multicentrico a piccole cellule con nucleo non inciso, di tipo Burkitt.

MATERIALI E METODI

Anamnesi
Il caso descritto riguarda un giovane suino di 9 mesi di età, facente parte di una partita di 140 suini, provenienti dal Nord Italia e regolarmente macellati a Roma ad ottobre 2008. Alla visita ante-mortem il soggetto non aveva presentato alcun sintomo di malattia o alterazione fisiologica ed era stato inviato alla fase di macellazione con giudizio ispettivo favorevole.
Esame post-mortem
Dopo la macellazione si è svolta la visita post-mortem e la carcassa ed i visceri sono stati esaminati dal punto di vista macroscopico (Regolamento CE 854/04) e, vista l'entità e le caratteristiche delle lesioni, avviati a distruzione. Sono stati quindi effettuati dei prelievi di fegato e milza per l'esame istopatologico.



Esame istopatologico
I tessuti fissati in formalina tamponata al 10% sono stati inviati al laboratorio di anatomo-istopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, sede di Roma, per l'esame istologico. Dopo inclusione in paraffina, sezioni di 5µm sono state colorate con ematossilina–eosina per la lettura al microscopio ottico.

RISULTATI

Esame post-mortem
All'esame macroscopico la carcassa appariva in buone condizioni generali. Il principale reperto macroscopico era costituito da una grave linfoadenomegalia generalizzata con aumento di volume degli organi fino a 10 volte rispetto a quello normale; in sezione la superficie si presentava bianco-grigiastra con evidenti emorragie ed aspetto lardaceo, mentre la consistenza era tenera e friabile. La milza mostrava una aumento moderato di volume con presenza di lesioni nodulari protrudenti dalla superficie che in sezione mostravano aspetto lardaceo. Analogamente il fegato si presentava ingrossato e fittamente disseminato di aree e noduli lardacei. Sono state riscontrate lesioni analoghe ma senza aumento di volume nel rene, nel polmone e sul cuore e neoformazioni diffuse al mesentere.

Esame istopatologico
Negli organi colpiti le lesioni neoplastiche erano caratterizzate dalla presenza di una popolazione cellulare monomorfa e diffusa, costituita da cellule linfoblastiche , fittamente stipate, con elevato indice mitotico e tra le quali si evidenziavano, regolarmente dispersi, numerosi macrofagi con ampio citoplasma chiaro che conferivano al tessuto un aspetto "a cielo stellato". Nella milza queste lesioni si spingevano ad infiltrare diffusamente la capsula e le trabecole connettivali, mentre nel fegato coinvolgevano prevalente-mente il tessuto perilobulare, conferendo alle lesioni un aspetto a mosaico.

DISCUSSIONE

Dall'esame post-mortem e con il supporto dell'esame istologico è evidente che il suino in oggetto di studio era colpito da una neoplasia linfoide, classificata come linfoma, diffuso a tutti i linfonodi, fegato, milza, cuore, polmoni, rene e mesentere.

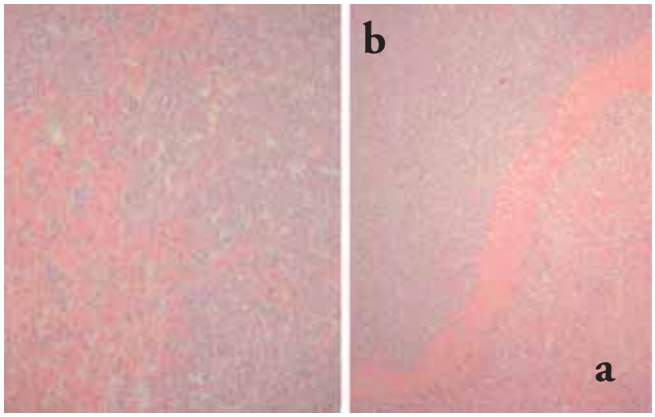


Figura 2. A sinistra: Fegato. Tessuto linfomatoso con aspetto a cielo stellato infiltrante il parenchima epatico. A destra: Milza. Tessuto normale (a) e linfomatoso infiltrante una trabecola connettivale (b).

Normalmente in questo tipo di linfomi la sintomatologia è molto blanda se non del tutto assente, probabilmente per il veloce sviluppo e la rapida metastatizzazione, che non permette alle sindromi paraneoplastiche correlate di svilupparsi. Anche nel caso descritto, alla visita ante-mortem non è stato possibile riscontrare alcuna alterazione clinicamente rilevabile, nonostante il grave aumento di volume e l'imponente infiltrazione linfoide evidenziata in particolare in fegato e milza.
La distribuzione macroscopica delle lesioni è caratteristica dei linfomi multicentrici descritti in letteratura, e permette di formulare un sospetto diagnostico che lascia poco spazio ad altre diagnosi differenziali. In passato alcuni autori hanno descritto casi di linfoma associati a marcate emorragie, considerando nella diagnosi differenziale forme cliniche di peste suina o setticemie; nel caso descritto, benché fossero evidenti emorragie nei linfonodi e in minor misura nella milza, tali patologie sono state escluse considerando l'imponente aumento di volume degli organi.
Tramite l'esame istologico, oltre a confermare il sospetto diagnostico, seguendo la classificazione NCIWF (National Cancer Institute Working Formulation) si è potuto classificare il tumore come linfoma diffuso, non follicolare, a piccole cellule con nucleo non inciso. La presenza di una disseminazione regolare di numerosi macrofagi diafani in mezzo all'uniforme popolazione linfocitaria, definita a "cielo stellato" ed osservata sia nella milza che nel fegato, permette di definire ulteriormente la neoplasia, subclassificandola come linfoma di tipo Burkitt, forma ad alto grado di malignità.

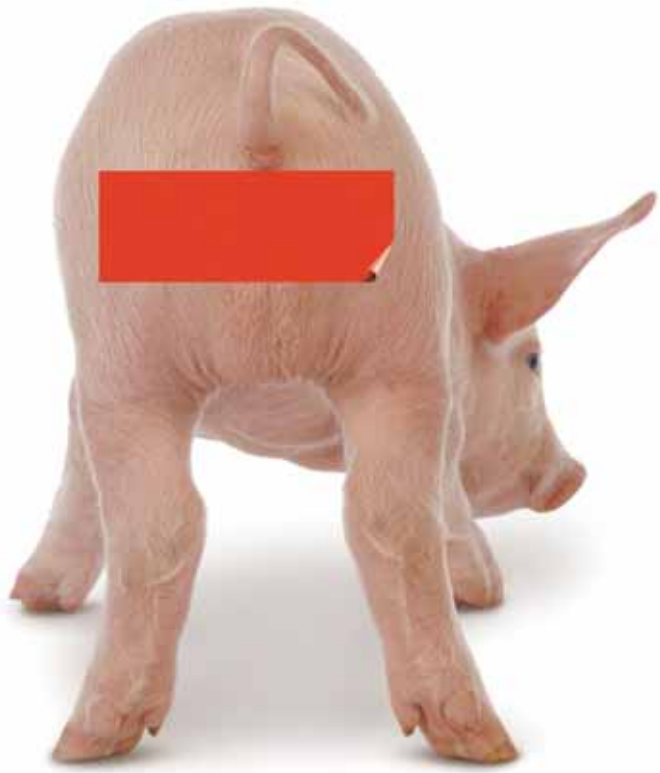
CONCLUSIONI

Il linfoma suino, sia pure raro, è poco segnalato nella recente bibliografia.
Le lesioni macroscopiche rilevate alla visita post-mortem devono sempre far sospettare questo tipo di tumore, benché poco comune; in casi meno conclamati infatti le lesioni possono essere confuse con altre patologie, pertanto assume ancora più importanza l'esame istologico come ausilio diagnostico.

Bibliografia

Eleni C., Marcato P.S., (1993). "La leucosi suina". Summa. 5, 25-29.
Head K. W., Campbell J. G., Imlah P., Laing A. H., Linklater K. A., McTaggart H. S., (1974). "Hereditary lymphosarcoma in a herd of pigs". Vet. Rec. 95, 523–527.
Marcato P.S. (2002) "Patologia sistematica veterinaria". Italia, Edagricole.
McTaggart, H. S., Laing A. H., Imlah P., Head K. W., Brownlie S. E., (1979). "The genetics of hereditary lymphosarcoma of pigs". Vet. Rec. 105, 36.
Meuten D.J. (2002) "Tumors in domestic animals". 4ed, Iowa, Iowa State Press.
Stevenson R.G., DeWitt W.F. (1973). "Case report: An unusual case of lymphosarcoma in a pig". Can. Vet. Jour., 14-6, 139-141.

STOP
ALLA COCCIDIOSI NEI SUINETTI



Le coccidiosi causano la maggior parte delle diarree dei suinetti nelle prime settimane di vita e sono responsabili di perdita di peso e aumento del tasso di mortalità. Cattive condizioni di salute portano a perdite economiche.

Bayer propone la soluzione sicura per tenere sotto controllo le coccidiosi, proteggere i suinetti e garantirne un accrescimento regolare, tutto in una sola somministrazione. Chieda maggiori informazioni al suo veterinario.

Bayer HealthCare

EFFICACIA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI KETOPROFENE NELLA PREVENZIONE DELLA SINDROME DISGALATTICA POST PARTUM DELLA SCROFA (SDPP) IN CONDIZIONI DI CAMPO.

EFFICACY IN THE SOMMINSTRATION OF KETOPROFEN FOR THE PREVENTION OF SDPP SYNDROME IN SOWS UNDER FIELD CONDITIONS

SABATÉ ELÍAS D, SALICHS FLORENSA M^., BOSCH RIERA J*., HOMEDES BEGUER J^.

^Veterinaria Esteve, Laboratorios Dr. Esteve S.A., Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221; Barcelona, Spain.
****Clinobs S.L. C/ Josep Tarradellas, 2 baixos 1; Banyoles, Girona, Spain***

Parole chiave: Ketoprofene; SDPP, Scrofe, Suinetti

Keywords: Ketoprofen, SDPP, sows, piglets

Riassunto. La sindrome SDPP é una patologia che spesso si manifesta in modo subclinico provocando un aumento della mortalità pre-svezzamento. L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'efficacia di una soluzione iniettabile di ketoprofene al 6% somministrata immediatamente dopo il parto, a scrofe apparentemente sane, come trattamento preventivo della SDPP, per mezzo della valutazione dei parametri produttivi dei suinetti. L'uso del prodotto Dinalgen Suini a base di Ketoprofene ha manifestato un vantaggio statistico significativo nel controllo della SDPP.

Summary. The SDPP Syndrome is a patology that many times is present only with a subclinical status, with an increasing in the piglets mortality rate. The scope of this study is to evaluate the efficacy of the disease control using a injectable Ketoprofen 6% solution with injection after the piglet birth in sows apparently in good conditions. Using the prodot Dinalgen Swine has demonstrate a excellent statistical advantage in the SDPP disease control.

INTRODUZIONE

La forma subclinica della Sindrome disgalattica post partum della scrofa (SDPP) è, probabilmente, il processo patologico più frequente nelle scrofe che hanno appena partorito (Lamana 2005). Nonostante possa arrivare a colpire un 9-13% delle scrofe riproduttrici, spesso passa inosservata, manifestandosi unicamente con un leggero aumento della mortalità pre-svezzamento (tra il 2 ed il 4%) a causa di una diminuzione della produzione lattea (Lamana 2005). Arnaud e coll. (1994) hanno dimostrato che il ketoprofene è efficace nel trattamento delle mastiti nelle forme cliniche di SDPP. Mediante questo studio è stato verificato se la somministrazione post-parto di Dinalgen® Suini, una soluzione Iniettabile di Ketoprofene al 6%, può prevenire la comparsa di questa sindrome e le sue conseguenze in animali apparentemente sani.

MATERIALI E METODI

In un allevamento dedicato alla produzione di suinetti sono state selezionate, a caso, 34 scrofe che avevano appena partorito un numero di suinetti per nidiata da 8 a 12, e che non presentavano nessun segno clinico di Mastite, Metrite o Agalassia.

Le scrofe sono state distribuite in 4 sale, in modo omogeneo per in quanto all'ordine di parto. Una volta alloggiate nelle gabbie, hanno ricevuto un trattamento di induzione del parto di 1ml di prostaglandina 24 ore prima della data prevista per il parto, e 3 ml di ossitocina a partire dalla nascita del primo

In seguito le scrofe sono state distribuite in modo randomizzato in due gruppi, uno dei quali ha ricevuto 3 mg/kg di ketoprofene (1ml/20 kg di Dinalgen® Suino Sol. Iniettabile 6%, Laboratorios Dr.Esteve S.A.), per via intramuscolare, in dose unica.

I suinetti sono stati pesati individualmente, ai giorni D0 (peso alla nascita), D7 e D19 (peso allo svezzamento) per calcolare il peso totale della nidiata e l'incremento di peso dei suinetti, come indicatori indiretti della produzione di latte. Sono state realizzate osservazioni cliniche di tutti gli animali quotidianamente, ed è stato effettuato un monitoraggio della mortalità dei lattonzoli.

RISULTATI E DISCUSSIONE

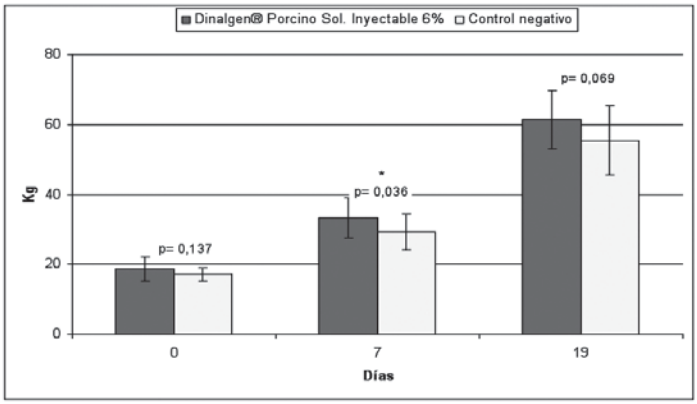
Come si osserva nella Figura 1, Al giorno 7, il peso delle nidiate del gruppo trattato con ketoprofene è stato significativamente superiore a quello del gruppo non trattato (29,16±5,15 vs 33,28±5,82 kg; p=0,036), mantenendo una tendenza positiva fino allo svezzamento (55,48±9,81 vs 61,37±8,33 kg; p=0,069).

Durante lo studio non sono state osservate differenze significative nel peso individuale dei suinetti, né nell'IPG. Pertanto la differenza di peso della nidiata osservata al giorno 7 , che corrisponde a 4,12 kg a favore del gruppo trattato, potrebbe spiegarsi a partire dalle differenze osservate nella mortalità dei suinetti per nidiata, che sono risultati, a loro volta, statisticamente significativi (Tabella 1). Di conseguenza, le scrofe trattate con ketoprofene hanno svezzato, in media, 1,06 suinetti in più rispetto a quelle non trattate (11,12 vs 10,06; p=0,004). Questi risultati confermano diversi riferimenti bibliografici, e potrebbero essere spiegati con una probabile diminuzione della produzione di latte durante i primi giorni post partum, associata ad una forma subclinica di SDPP nelle scrofe che non hanno ricevuto il trattamento.

Tabella 1. Mortalità dei suinetti;
Table 1. Piglets mortality

	Controllo	Dinalgen®	P
Suinetti/nidiata Giorno 0	11,29±0.849	11,59±1.004	>0,05
Suinetti svezzati/nidiata	10,06±1.088	11,12±0.857	0,004
Decessi (suinetti/nidiata) Giorno 19	1,24±1.480	0,47±0.624	0,058
Mortalità/nidiata (%) Giorno 19	10,4± 11.67	3.9 ± 5.39	0.045

Figura 1. Evoluzione del peso della nidiata durante lo studio (media ± DS).
Figure 1. Evolution of piglets weight during the study period



La differenza di peso della nidiata allo svezzamento è stata di 5,89 kg per nidiata a favore del gruppo trattato, Questa differenza non risulta statisticamente significativa, anche se ha dimostrato una tendenza positiva (p=0,069) a favore di Dinalgen® Suino Soluzione iniettabile 6%.

Tabella 2. Confronto della mortalità tra i due gruppi; Comparison about mortality between the groups

	Controllo		Dinalgen®	
	% sui suinetti totali	% sul totale dei decessi	% sui suinetti totali	% sul totale dei decessi
Decessi prima del giorno D7	17/191	17/21	6/197	6/8
	(8,9%)	(81%)	(3.05%)	(75%)
Decessi da D7a D19	4/174	4/21	2/191	2/8
	(2,30%)	(19%)	(1,05%)	(25%)

Nella Tabella 2 si può osservare che in entrambi i gruppi la maggioranza dei decessi si sono concentrati nella prima settimana di vita dei suinetti (81% del gruppo controllo e 75% del gruppo trattato). Questi risultati confermano diversi riferimenti bibliografici che descrivono la mortalità nelle sale parto come decessi che avvengono principalmente nel periodo neonatale, che corrisponde alla prima settimana di vita.

CONCLUSIONI

Il trattamento post partum con Dinalgen®Suino Sol. Iniettabile 6% produce un effetto positivo, statisticamente significativo, sulla mortalità dei suinetti, nº totale dei suinetti svezzati e peso della nidiata, confermando così la propria efficacia nella prevenzione della SDPP.

Bibiliografia

1. LAMANA J.M. (2005) Síndrome de disgalaxia posparto en cerdas. Av. Tecnol. Porc. 2 (3): 25-38.
2. ARNAUD, J.P., POMMIER, P. WESSEL-ROBERT, S., CONSALVI, P.J. (1994) Assessment of efficacy of ketoprofen in the treatment of MMA syndrome in sows. Proc. 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June, p.360
3. Informe interno Lab. Echevarne nºA3401-02 (2005)
4. SHINTANI ET AL. (1967) Toxicol. Appl. Pharmacol., 11, 293-301
5. Informe interno nº CD-98/6329FC. veterinaria ESTEVE. Laboratorios Dr. ESTE VE S.A. (1999)
6. Informe interno nº EV-01/04SN. veterinaria ESTEVE. Laboratorios Dr. ESTEVE S.A. (2001)
7. MARTINEAU, G.P.; SMITH, B.B.; DOIZE, B. (1992) Pathogenesis, prevention and treatment of lactational insuficiency in sows. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 8 (3): 661-684.
8. WIDOWSKI-T-M, CURTIS-S-E, DZIUK-P-J, WAGNER-W-C, SHERWOOD-O-D. (1990) Behavioral and endocrine responses of sows to prostaglandin F2 alpha and cloprostenol. Biology of Reproduction; vol 43; nº2; pp 290-297.

CONTROLLO DELLA DIFFUSIONE DI ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE SULLA LINEA SCROFA-SUINETTO MEDIANTE MARBOFLOXACINE INIETTABILE (MARBOCYL® 10%)

CONTROL OF SOW TO LITTER SPREADING OF APP BY INJECTABLE MARBOFLOXACINE (MARBOCYL® 10%)

VITTORIO SALA (*), CLAUDIA GUSMARA (*), FLAVIA INVERNIZZI (°), CARLO GAZZA (^)

(*) Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Università di Milano (°) Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche – Università di Milano (^) A.T.I. – Ozzano Emilia (BO)

Parole chiave: APP, suino, marbofloxacine.

Key words: APP, swine, marbofloxacine.

Riassunto. È stato valutato, con risultati molto favorevoli, l'impiego strategico di marbofloxacine iniettabile nel periparto della scrofa e post-svezzamento nei suinetti, allo scopo di controllare e prevenire da diffusione delle infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. È stata osservata una riduzione generalizzata della mortalità da cause batteriche in sala parto, svezzamento e magronaggio, regolarmente correlata a un aumento degli incrementi ponderali medi di fase e di ciclo. Questi ultimi sono risultati statisticamente significativi, così come la numerosità degli isolamenti di A. *pleuropneumoniae* dai tamponi nasali di scrofe e suinetti. In conclusione, l'impiego strategico di marbofloxacine iniettabile rappresenta un valido strumento nel controllo e nella prevenzione della pleuropolmonite del suino.

Abstract. The strategic use of injectable marbofloxacine in the sow peripartum and during the post-weaning period with the purpose to prevent the diffusion of the Actinobacillus pleuropneumoniae infection has been evaluated with very favourable results. A general reduction of the mortality rates due to bacterial causes has been observed in the farrowing units, but the benefit has been extended to weaning and growing period. The sanitary results have been regularly related to an increase of the average weight gains along the production cycle. These last results have been statistically significative, so as the isolations rates of A. pleuropneumoniae from the nasal swabs of sows and weaners. Finally, the strategic use of injectable marbofloxacine can be a valid tool in the control and prevention of swine pleuropneumonia.

INTRODUZIONE

Mortalità e danno produttivo nelle forme cliniche di pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) dipendono dalla patogenicità del clone batterico coinvolto, ma anche da situazioni sanitarie e gestionali più o meno favorenti, come la presenza di animali portatori-eliminatori, la scarsa qualità dell'aria e le forzature alimentari; nella messa a

terra, l'infezione diffonde dopo il ristallo e la formazione dei gruppi, ma l'evoluzione della malattia dipende dalle condizioni ambientali, soprattutto per quanto riguarda la densità dei suini e l'escursione termica.
Oltre alla mortalità acuta, è frequente la forma cronica, i cui sintomi più tipici sono la tosse intermittente e l'inappetenza, che causa una riduzione progressiva degli incrementi poderali; in tali condizioni, la comparsa di altre patologie, non solo respiratorie, può determinare recidive tipicamente acute.
Un controllo strategico organizzato può ridurre il danno economico e deve iniziare dalle misure gestionali, il cui obiettivo è impedire la trasmissione dell'infezione, soprattutto tra soggetti di età diversa: a questo scopo sono utili vaccinazione e medicazione strategica; esistono anche metodi di eradicazione basati sull'uso combinato di medicazione e segregazione dei gruppi per età, ma nella concretezza della pratica aziendale, è logico chiedersi se la negativizzazione della produzione sia effettivamente possibile o se l'obiettivo massimo raggiungibile sia quello di contenere il danno attraverso un controllo programmato dei livelli d'infezione.
Nelle forme acute e peracute, è indispensabile trattare con antibiotici a dosaggi elevati per via parenterale i suini colpiti e quelli conviventi, ricordando che l'efficacia dipende dall'applicazione integrale dello schema posologico e che il successo terapeutico è tanto maggiore quanto più tempestivo è l'intervento.
In anni recenti, per ovviare alla minor efficacia delle medicazioni per *os*, principalmente dipendente dall'irregolarità di assunzione della dose minima efficace da parte di tutti gli animali, è stato proposto l'impiego strategico delle preparazioni antibiotiche iniettabili, somministrate ripetutamente oppure a dosaggio elevato.
L'esperienza di sperimentazione e di campo maturata negli ultimi anni, ha confermato il ruolo primario delle scrofe nella propagazione aziendale di Actinobacillus pleuropneumoniae; infatti, la scrofaia è il serbatoio di mantenimento attraverso la rimonta interna, o l'ambito di espansione di nuove infezioni e antibiotico-resistenze grazie a quella esterna.
Sala parto e svezzamento diventano gli ambiti in cui iniziano i cicli infettivi aziendali, e le scrofe portatrici determinano i livelli d'infezione delle loro figliate, condizionati dalle strutture e dal management igienico e sanitario, senza dimenticare la presenza concomitante delle infezioni e delle patologie d'induzione, che interferiscono sui meccanismi difensivi sistemici e locali.
La quantità delle infezioni trasmesse dalle scrofe ai suinetti determina anche l'entità della circolazione nei gruppi di svezzamento, dove le cariche infettanti sono destinate ad aumentare in coincidenza con l'esaurimento dell'immunità di derivazione materna, e l'incidenza delle forme di pleuropolmonite nella messa a terra, condizionata da qualità dell'aria, rimescolamento, alimentazione, vaccinazioni e trattamenti.
Su queste basi, ci siamo proposti di valutare la possibilità di controllare la diffusione di Actinobacillus pleuropneumoniae attraverso l'impiego strategico di Marbofloxacine iniettabile sulle scrofe e nelle fasi critiche dello svezzamento.

MATERIALI E METODI

Allevamento e animali
Le prove sono state condotte in un allevamento a ciclo chiuso di 300 scrofe Large White per la produzione di scrofette F1 da rimonta; la situazione sanitaria è caratterizzata da

episodi ricorrenti di pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* nelle fasi iniziali della messa a terra, nonostante il controllo efficace delle infezioni d'induzione (PRRSV e *M. hyopneumoniae*) ottenuto attraverso la consueta pianificazione vaccinale e periodicamente confermato dai rilievi sierologici e di macellazione.
La formazione dei gruppi di svezzamento avviene attraverso due scelte per dimensione a 25 giorni di vita, separando in base al peso i maschi dalle femmine in purezza (per la rimonta interna) e queste ultime da quelle destinate alla vendita; i gruppi così formati sono ristallati in sale lavate e disinfettate ad ogni ciclo, attrezzate con le tradizionali gabbiette sollevate, provviste di pavimentazione in grigliato e in condizioni di oggettivo sovraffollamento (10% di soggetti in più). Il tempo di permanenza è mediamente di quaranta giorni, durante i quali gli animali sono alimentati ad *libitum* con mangime sfarinato di produzione aziendale medicato con colistina solfato (120 ppm) per i primi 10 giorni; i locali sono mantenuti a temperatura costante e il ricambio dell'aria è assicurato da ventole in estrazione.
I lattoni così prodotti sono trasferiti, mantenendo gli stessi gruppi della fase precedente, nelle strutture di magronaggio, anch'esse gestite in regime tutto pieno – tutto vuoto e provviste di pavimentazione in grigliato di cemento; la permanenza media è di 40-45 giorni e il rapporto animale-superficie è ottimale. La ventilazione è in estrazione e l'alimentazione è ad libitum con mangime pellettato, privo di qualsiasi medicazione.
La situazione sanitaria è caratterizzata dalla comparsa occasionale, soprattutto nelle figliate delle primipare, di forme enteriche neonatali su base colibacillare e di casi di epidermite essudativa; nello svezzamento, è storicamente presente la malattia degli edemi, che, tuttavia, negli ultimi mesi è stata controllata attraverso modifiche mirate della composizione delle razioni.
Le forme respiratorie acute o peracute della fase di magronaggio, principalmente dovute ad *Actinobacillus pleuropneumoniae*, costituiscono il vero problema sanitario ed economico dell'azienda, iniziano 7-10 giorni dopo il ristallo e portano a morte gli animali in breve tempo (1-2 giorni).

Trattamenti e gestione dei gruppi sperimentali
Sono stati utilizzati sei gruppi di 14 scrofe ciascuno; i due di controllo non sono stati trattati, mentre i quattro in prova hanno ricevuto Marbocyl 10%, in ragione di 4 mg di marbofloxacine per kg p.v.; i trattamenti iniettivi intramuscolari sono stati eseguiti 2 giorni pre-parto, il giorno del parto e due giorni dopo.
Durante tutto il ciclo, le figliate di controllo sono state mantenute rigidamente separate da quelle in prova, che sono state nuovamente trattate, con lo stesso prodotto e al medesimo dosaggio, 15 giorni dopo lo svezzamento, in coincidenza con l'esaurimento dell'immunità di derivazione materna.

Prelievi e diagnosi
Sulle scrofe, all'ingresso in sala parto, sono stati eseguiti tamponi nasali ed è stato prelevato un campione ematico, per la preparazione di emosiero individuale destinato alle diagnosi sierologiche; anche quaranta suinetti per gruppo, scelti in modo randomizzato tra quelli di medio peso, sono stati sottoposti a prelievo ematico e tamponi nasali al termine del periodo di svezzamento.
Le diagnosi sono state orientate dalle osservazioni epidemiologiche, cliniche e dalle lesioni necroscopiche; sui tamponi nasali è stata eseguita la ricerca selettiva di A. *pleuropneumo-*

niae, mentre sui prelievi *post-mortem* sono stati attivati tutti gli accertamenti batteriologici volti a stabilire l'eziologia del processo.
Le diagnosi sierologiche sono state condotte utilizzando kit immunoenzimatici dell'ambito IDEXX, specifici per PRRSV e APP; in quest'ultimo caso, anche in rapporto alla natura della prova sperimentale (efficacia terapeutica e preventiva), si è preferito l'impiego di un'ELISA basata su ApxIV, anziché di prove specifiche per i singoli sierotipi.
I rilievi produttivi hanno considerato la mortalità e gli scarti delle tre fasi, il peso medio dei gruppi al termine delle stesse, e l'incremento ponderale medio giornaliero per ciascuna; sui dati ottenuti è stata eseguita, ove possibile, una valutazione della significatività statistica delle differenze.

Analisi statistica
È stata condotta attraverso l'applicazione del T-test (t di Student) e considerando i parametri numerici relativi a mortalità e crescite di fase, ma anche agli incrementi ponderali medi giornalieri (IPMG); nell'ambito diagnostico sono state analizzate, con lo stesso metodo, le differenze delle sieroprevalenze e quelle riguardanti la numerosità degli isolamenti di APP dai tamponi nasali.

Risultati e discussione
I risultati ottenuti, ordinati nelle tabelle seguenti, comprendono le osservazioni diagnostiche, sierologiche e batteriologiche, nonché le rilevazioni numeriche relative ai parametri clinici (mortalità) e zootecnici (pesi iniziali e finali di fase, IPMG); sia i referti diagnostici, sia i dati produttivi, sono stati suddivisi per fase (sala parto, svezzamento e magronaggio).

Sala parto

Gruppo	n. scrofe	Positive ELISA Apx IV	APP da tamponi nasali	Positive ELISA PRRSV
C 1	14	13 (92,86%)	6 (42,86%)	4 (25,57%)
C 2	14	14 (100%)	5 (35,71%)	3 (21,43%)
T 3	14	14 (100%)	7 (50%)	5 (35,71%)
T 4	14	12 (85,71%)	4 (25,57%)	6 (42,86%)
T 5	14	11 (78,57%)	5 (35,71%)	4 (25,57%)
T 6	14	12 (85,71%)	7 (50%)	4 (25,57%)

Tabella 1. Esiti diagnostici sierologici e batteriologici sui sei gruppi di scrofe in esperimento.

È, prima di tutto, opportuno osservare che i livelli di sieroprevalenza APP nelle scrofe sono uniformemente elevati; la differenza tra i due gruppi (controllo e trattate) non è statisticamente significativa (t di Student = 1,26; p = 0,2762) e ciò, rispetto alle prospettive dell'esperimento, costituisce un'indicazione altamente positiva.
Lo stesso si può affermare riguardo alle sieroprevalenze nei confronti di PRRSV: anche in questo caso, la mancanza di significatività statistica (t di Student = 1,6013; p = 0,1846) indica che la possibile interferenza del virus nella circolazione dell'infezione actinobacillare e sulla recettività dei suinetti è verosimilmente molto relativa.
È inoltre opportuno aggiungere, per completezza d'informazione, che anche la circolazio-

ne di *M. hyopneumoniae* è molto limitata, come hanno dimostrato i punteggi polmonari ripetutamente eseguiti applicando il metodo quantitativo di Madec & Kobish (1982).
Le quote di eliminazione dell'infezione actinobacillare, rilevate attraverso tamponi nasali eseguiti all'ingresso in sala parto, sono numericamente più contenute rispetto al numero di scrofe sieropositive; anche in questo caso, le differenze non sono statisticamente significative (t di Student = 0,2144; p = 0,8407), ma ciò costituisce una garanzia rispetto ai livelli di circolazione dell'infezione nei gruppi in esperimento.
Al riguardo, è indispensabile ricordare i limiti del prelievo mediante tampone come metodo di rilevamento dei soggetti portatori-eliminatori di un patogeno; cionondimeno, permane la possibilità di una circolazione successiva dell'infezione in forza delle scelte manageriali (rimescolamento alla formazione dei gruppi di svezzamento).

Sala parto	n. scrofe	nati vivi	perdite	peso medio (kg)
Controllo 1	14	148	18 (12,16%)	6,5
Controllo 2	14	146	19 (13%)	6,7
Totale	28	294	37 (12,6%)	6,6
Trattato 3	14	135	7 (5,2%)	8,7
Trattato 4	14	141	9 (6,4%)	8,2
Trattato 5	14	139	7 (5%)	9
Trattato 6	14	145	9 (6,7%)	8
Totale	56	560	32 (5,7%)	8,47

Tabella 2. Dati produttivi e sanitari nelle sei sale parto in esperimento.

A fronte di un numero di suinetti nati anche visibilmente sovrapponibile, le perdite sono significativamente maggiori nelle sale parto non trattate (t di Student = 11,43; p = 0,000); oltre che negli aspetti sanitari (riduzione della mortalità) è possibile che il trattamento abbia diminuito tutte le quote infettanti eliminate dalle scrofe, con un beneficio produttivo evidente: infatti, il peso medio dei suinetti provenienti dalle scrofe trattate è significativamente più elevato rispetto a quello dei controlli (t di Student = 5,38; p = 0,006).
È inoltre verosimile che l'intervento abbia tutelato gli equilibri organici della scrofa nel periparto, migliorando di conseguenza qualità e quantità del latte, con evidenti benefici in termini d'incrementi ponderali.

Svezzamento

Gruppo	n. svezzati	t. nasali	Isolamenti APP	Morti	Batteriologia
C 1	130	40	12 (30%)	8	4 E. coli emolitico, 2 P.m., 2 N.R.S.
C 2	127	40	10 (25%)	6	5 E. coli emolitico, 1 salmonellosi, 1 N.R.S.
T 3	128	40	5 (12,5%)	1	E. coli emolitico
T 4	132	40	3 (7,5%)	2	1 E. coli emolitico, 1 Salmonella sp.
T 5	132	40	4 (10%)	2	2 E. coli emolitico
T 6	136	40	2 (5%)	2	1 E. coli emolitico, 1 polmonite virale

Tabella 3. Referti batteriologici relativi alla fase di svezzamento.
Legenda. N.R.S. = nessun reperto significativo; P.m. = Pasteurella multocida.

La differenza numerica degli isolamenti di *A. pleuropneumoniae* dai tamponi nasali dei gruppi di controllo rispetto a quelli trattati è statisticamente significativa (t di Student = 6,54; p = 0,0028); questa indicazione è assai positiva, se si considera che, nell'economia "aziendale" della pleuropolmonite, lo svezzamento rappresenta normalmente la fase di consolidamento delle infezioni che si manifestano clinicamente all'inizio della messa a terra. Ciò consolida anche la prima evidenza, relativa all'efficacia del trattamento sperimentato.

Gruppo	n. svezzati	Positivi ELISA Apx IV	Positivi ELISA PRRSV
C 1	40	22 (55%)	25 (62,5%)
C 2	40	19 (47,5%)	32 (80%)
T 3	40	12 (30%)	22 (55%)
T 4	40	10 (25%)	19 (47,5%)
T 5	40	11 (44%)	26 (65%)
T 6	40	8 (20%)	24 (60%)

Tabella 4. Sieroprevalenze nei suinetti a fine svezzamento.

Le differenze nelle sieroprevalenze tra i due gruppi sono statisticamente significative per ApxIV (t di Student = 6,50; p = 0,0029), ma non per PRRSV; il trattamento ha ridotto le infezioni da APP durante lo svezzamento, confermando le indicazioni dei tamponi nasali.

Svezzamento	n. animali	peso medio (kg)	giorni	n. morti	n. scarti	n. usciti	peso medio (kg)	IPMG (kg)
Controllo 1	130	6,5	40	8	4	118	24	0,438
Controllo 2	127	6,7	41	6	5	116	25,7	0,463
Totale/Media	257	6,6	==	14 (5,4%)	9	234	24,85	0,450
Trattato 3	128	8,7	39	1	0	127	30	0,546
Trattato 4	132	8,2	42	2	10 venduti	122	30	0,519
Trattato 5	132	9	52	2	77 venduti	53	31,9	0,440
Trattato 6	136	8	45	2	9 venduti	123	28,7	0,460
Totale/Media	528	8,475	==	7 (1,7%)	==	425	30,15	0,491

Tabella 5. Dati produttivi e sanitari della fase di svezzamento.

La vendita di parte dei lattoni, che fa parte della normale gestione aziendale, ha interessato tre dei gruppi trattati, ma solo nel gruppo 5 l'interferenza è stata sensibile (-77 suinetti), mentre non ha sensibilmente modificato la numerosità dei gruppi 4 (-10 suinetti) e 6 (-9 suinetti); l'analisi statistica è stata comunque condotta sui dati cumulativi.
Per la ridotta numerosità delle osservazioni, non sono statisticamente significative le differenze delle mortalità (t di Student = 5,09; p = 0,103) e quindi le perdite dei controlli non sono significativamente più alte rispetto a quelle dei trattati; è invece statisticamente significativa la differenza nel peso medio in uscita (t di Student = - 4,74; p = 0,009): il peso medio dei suinetti non trattati è, al termine dello svezza-

mento, significativamente più basso rispetto a quelli trattati.
Al contrario, non è significativa la differenza tra l'IPMG dei due gruppi (t di Student = -1,078; p = 0,342); di fatto, la crescita dei controlli non è significativamente inferiore a quella dei trattati.

Magronaggio

Gruppo	n. magroni	Morti	Batteriologia
C 1	118	8 (6,8%)	8 APP
C 2	116	7 (6%)	5 APP, 2 P.m.
T 3	127	5 (3,9%)	4 APP, 1 P.m.
T 4	122	0 (0%)	
T 5	53	1 (1,9%)	1 APP
T 6	123	1 (0,8%)	1 P.m.

Tabella 6. Mortalità e dati diagnostici riferiti al magronaggio.
Legenda. APP = Actinobacillus pleuropneumoniae; P.m. = Pasteurella multocida.

La prima osservazione è da riferire alla mortalità: il numero dei morti nei gruppi di controllo è significativamente più elevato rispetto a quelli nei trattati (t di Student = 3,400; p = 0,027) e le diagnosi batteriologiche hanno dimostrato la maggiore incidenza della pleuropolmonite da *A. pleuropneumoniae* rispetto alla broncopolmonite da *P. multocida*. Nonostante la sensibilità totale degli isolamenti a marbofloxacine, le lesioni hanno avuto una gravità ed una rapidità evolutiva tale da impedire la diffusione del principio attivo, principalmente a motivo dell'azione delle tossine sul microcircolo polmonare; perciò, l'efficacia terapeutica è stata penalizzata dalla maggior rapidità dell'evoluzione clinica rispetto alla concentrazione tissutale.

Magronaggio	n. animali	giorni	n. morti	n. scarti	n. usciti	peso medio (kg)	IPMG (kg)
Controllo 1	118	50	8	4	106	42,9	0,378
Controllo 2	116	48	7	6	103	43,8	0,377
Totale/Media	234	==	15 (6,41%)	10 (4,27%)	209	43,35	0,377
Trattato 3	127	48	5	2	120	49,8	0,413
Trattato 4	122	48	0	10	112	61,5	0,656
Trattato 5	53	31	1	5	47	50,2	0,590
Trattato 6	123	31	1	6	53	50,2	0,694
Totale/Media	425	==	7 (1,65%)	23 (5,41%)	332	52,92	0,588

Tabella 7. Dati produttivi e sanitari della fase di magronaggio.

Nonostante le evidenze apparentemente assai confortanti, le differenze nel peso medio dei gruppi a fine periodo non sono statisticamente significative (t di Student = -2,22; p = 0,090): la crescita dei controlli non è significativamente più bassa rispetto a quella dei trattati, e lo stesso si può affermare riguardo all'IPMG (t di Student = -2,25; p = 0,087).

CONCLUSIONI

Nell'azienda in prova, anche in assenza delle infezioni d'induzione, la selezione dei cloni di *A. pleuropneumoniae* a elevata patogenicità ha aumentato l'incidenza delle forme cliniche acute e le quote di mortalità; inoltre, la selezione delle scrofette da rimonta in strutture infette ha progressivamente elevato il numero di scrofe eliminatrici nel periparto, e di conseguenza le cariche infettanti nello svezzamento, nonché le forme cliniche nel flusso continuo; ciò ha costituito, di fatto, un circolo "epidemiologicamente" vizioso, la cui interruzione rappresenta l'unica possibilità di riportare a livelli accettabili lo stato sanitario aziendale.

Le indicazioni sperimentali dimostrano che i livelli d'infezione della scrofaia sono collegati all'incidenza clinica delle patologie nella messa a terra; questa correlazione, ovvia per le patologie della sala parto e del primo svezzamento, è più difficilmente accettabile per le patologie del magronaggio, che compaiono dopo parecchie settimane dal contatto con la scrofa.

Pertanto, la riduzione dei livelli d'infezione attraverso interventi mirati sulle scrofe nel periparto, è l'unica soluzione realmente efficace; nello specifico del prodotto utilizzato (Marbocyl 10%), è stata dimostrata la possibilità di ottenere risultati sanitari e produttivi apprezzabili sul lungo periodo, anche in assenza delle tradizionali formulazioni "long-acting", semplicemente razionalizzando la somministrazione del principio attivo rispetto alle fasi di maggior circolazione dell'infezione. Questa prospettiva è stata ovviamente rafforzata dalla constatazione che nessuno dei ceppi batterici isolati in azienda ha mostrato resistenza a marbofloxacine.

La significatività statistica della riduzione della mortalità in sala parto e del maggior peso vivo di svezzamento sono indicative della convenienza economica del trattamento con marbofloxacine; in prospettiva, potrebbe essere utile applicare il trattamento iniettivo strategico in uno svezzamento medicato controllato, destinato alla produzione di scrofette da rimonta indenni dall'infezione.

Bibliografia

- Gottschalk M. (2005). Are all serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* pathogenic? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Gottschalk M. (2005). How are we able to give a herd certification of "free *Actinobacillus pleuropneumoniae infection*". Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Madec, F. & Kobisch M. (1982). Bilan lesionnel des poumons de porcs charcutiers a l'abattoir. Journ. Rech. Porc. Fr. 14, 405–412.
- Mieli L. (2005). How to interpret serological results regarding serotype or Apx? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Mieli L. (2005). Should a herd become seronegative? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Morvan H. (2005). Is the notion of biotype important for the swine practitioners? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Morvan H. (2005). How are we able to identify an isolate App in a suspect herd but without clinical signs? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Pejsak Z. (2005). What are the main sources of transmission of a herd regarding its structure production? What is the importance of airborne transmission and area spread transmission (or regional transmission)? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Pejsak Z. (2005). The medical control of the disease (clinical disease). Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Sorensen V. (2005). Do we observe variation in virulence among some strains within a given serotype of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.
- Sala V., Beghian M.A. & Piccinini R. (1990). Control of Str. suis type 2 pathologies by long acting amoxycillin in Italian swine herds" Proceedings of the 11th I.P.V.S. Congress, (Lausanne, 1990), pag. 189.
- Sorensen V. (2005). What are strategic control as well as strategic eradication programs? Vetoquinol International Symposium "From APP to PPP". Madrid, June 16-17, 2005.

STUDIO DELL'EFFICACIA DEL KETOPROFENE IN SOLUZIONE ORALE, SOMMINISTRATO SECONDO UN NUOVO SCHEMA TERAPEUTICO, COME TRATTAMENTO COMPLEMENTARE NEL COMPLESSO RESPIRATORIO DEL SUINO (CRS).

STUDY ABOUT THE EFFICACY OF KETOPROFEN ORAL USED FOLLOWING A NEW COMPLEMENTARY TREATMENT APPLICATION IN CASE OF C.R.S. SYMDROME IN SWINE

SALICHS FLORENSA, MARTA* DVM - COLL MASVIDAL, TERESA# DVM - SABATÉ ELÍAS, DAVID* DVM PHD - HOMEDES BEGUER, JOSEP* DVM, MS, PHD.

veterinaria Esteve, Laboratorios Dr. Esteve S.A., Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221; Barcelona, Spain. #Test and Trials S.L., Partida La Caparella 97, Edifici CEEI 2, mòdul 8, Lleida, Spain

Parole chiave: *Ketoprofene, Half dose, CRS*

Key words: *Ketoprofene, metà dose, CRS*

Riassunto. L'efficacia del Ketoprofene per OS come completamento nel trattamento della terapia del Complesso Respiratorio del Suino (CRS) è descritta da diversi autori. In questo studio svolto su un gruppo di suini all'ingrasso colpiti dalla sindromem è stata eseguita una somministrazione a metà dose rispetto a quella terapeutica descritta nel foglietto informativo del prodotto. Analizzati e comparati i dati tra un gruppo trattato con associazione Ketoprofene+Doxiciclina ed uno solo con Doxiclina, si è registrato una diminuzione rapida della febbre degli animali del primo gruppo dove era applicata l'associazione di trattamento (misurata come temperatura rettale) ed un miglioramento di altri indici come sintolmatologia respiratoria, mortalità e consumo alimento.

Abstract. The efficacy of Ketoprofen via OS lilke complementary tratment in the CRS syndrome associated with anibiotic (Doxicyclin) is described by several authors. This study is presenting a field experience using a product based on Ketoprofen but with somministration of half dose respect what officially described by the product. After comparison between the two groups of animals (one group treated with Ketoprofen+Doxicyclin and a second group treated only with Doxicyclin). The efficacy in the first group was clearly demonstrated by the rapid reduction in the rectal temperature in pigs, together with a better evolution of other parameters like respiratory index , mortality rate and food consumption.

INTRODUZIONE

L'efficacia del ketoprofene in soluzione orale come trattamento complementare alla terapia antibatterica nel CRS è già stata confermata da vari studi clinici (Illán et al. 2001 e 2002, Hellmann et al. 2003) somministrando 3 mg/kg/giorno di ketoprofene nell'acqua

di bevanda. Tuttavia, i risultati di uno studio sperimentale (Sabaté et al. 2001) hanno evidenziato che la sua somministrazione a metà dose (1,5 mg/kg) genera una diminuzione della temperatura rettale della stessa entità rispetto alla dose terapeutica (3 mg/kg) anche se in modo lievemente più tardivo. Questi risultati indicano che la dose di 1,5 mg/kg potrebbe risultare efficace come trattamento sintomatico in questa specie, in animali che presentano una sintomatologia lieve.

MATERIALI E METODI

In un allevamento da ingrasso nel quale era stato diagnosticato un episodio di Polmonite Enzootica (*Micoplasma hyopneumoniae*) complicato dalla comparsa di *Bordetella bronchiseptica* ed *Haemophilus parasuis*, sono stati selezionati 120 suini che presentavano una sintomatologia lieve (temperatura rettale superiore a 39.9 ºC ma inferiore ai 41 ºC ed almeno uno dei seguenti sintomi: dispnea, tosse, muco nasale o depressione). Gli animali sono stati identificati individualmente, e sono stati distribuiti random in due gruppi di uguali dimensioni, ognuno dei quali era dotato di una linea indipendente di distribuzione di acqua, collegato ad un deposito di medicinale. Entrambi i gruppi hanno ricevuto una specialità antibiotica a base di Doxiciclina, in ragione di 10 mg/kg/giorno, durante un periodo di 5 giorni (da D1 a D5) mediante l'acqua di bevanda. Uno dei gruppi ha ricevuto, inoltre, durante i primi 3 giorni, (da D1 a D3), ketoprofene in soluzione orale (Dinalgen® Soluzione Orale, Laboratorios Dr.Esteve S.A.) sempre con l'acqua di bevanda. Durante il periodo di monitoraggio (da D0 a D10), sono stati registrati vari parametri clinici: temperatura rettale degli animali (variabile principale per valutare l'efficacia), sintomatologia respiratoria, (dispnea, tosse, muco nasale, depressione), mortalità, peso e consumo di alimento (a partire dai quali è stato calcolato l'indice di conversione).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La temperatura rettale degli animali trattati con ketoprofene+Doxiciclina è diminuita in modo più rapido rispetto a quella degli animali trattati unicamente con Doxiciclina. La diminuzione della temperatura tra D0 e D1 nel gruppo ketoprofene+Doxiciclina, è stata di 0,6 ºC ($P<0,0001$), mantenendosi intorno ai 40,0 ºC fino a D3 ed a partire da D4 al di sotto di 39,9 ºC. Diversamente, nel gruppo Doxiciclina la temperatura è addirittura aumentata tra i giorni D0 e D1, di 0,4 ºC ($P<0,0001$) iniziando, a partire da questo giorno, a diminuire gradualmente. Le differenze tra entrambi i gruppi sono state statisticamente significative ($P<0,05$) fino al giorno D4.
Anche tra i giorni D2 e D5 sono state osservate differenze significative nella percentuale di animali con dispnea, tosse, muco e depressione, a favore del gruppo trattato con ketoprofene (Chi Quadr. $p<0,05$). Anche la media dell'incremento ponderale e dell'indice di conversione sono stati migliori nel gruppo ketoprofene, anche se non si sono osservate differenze significative dopo 10 giorni.

CONCLUSIONI

Questo studio conferma l'efficacia della somministrazione di ketoprofene in soluzione orale come coadiuvante del trattamento antibiotico del Complesso Respiratorio del Suino, alla dose di 1,5 mg/kg/giorno in casi con sintomatologia lieve.

Bibliografia

1. *ILLÁN S. and SABATÉ D. (2001) Clinical Efficacy Study of EV-4517 as an adjunctive treatment to anti-infective therapy in Porcine Respiratory Disease. Internal Report Laboratorios Dr. Esteve nr. EV-99/06SN-2.*
2. *ILLÁN S., SABATÉ D. and HOMEDES J. (2002) Tolerance study of EV-4517 in pigs under field conditions Internal Report Laboratorios Dr. Esteve nr. EV-01/13SN.*
3. *HELLMANN K, and RADELOFF I. (2003) Clinical Efficacy of EV-4517 as a complement to antibiotic treatment in Porcine Respiratory Disease. Internal Report KLIFOVET nr. 102211.*
4. *SABATE D. and HOMEDES J. (2001) Efficacy study of specialities EV-4518 and EV-4517 as antipyretic agents in pig. Internal Report Laboratorios Dr. Esteve nr. EV-01/02SN.*

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULL'INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM SPP.* NEI CINGHIALI DELLA REGIONE PIEMONTE

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MYCOBACTERIUM SPP. INFECTION IN WILD BOAR OF PIEDMONT REGION

FRINE ELEONORA SCAGLIONE*, DAVIDE GRANDE*, SERENA ROBETTO, RICCARDO ORUSA**, EZIO FERROGLIO*, ENRICO BOLLO***

** Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria*
*** Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*

Parole chiave: Tubercolosi, cinghiale, *Mycobacterium* spp.

Key words: Tuberculosis, wild boar, *Mycobacterium* spp.

Riassunto. Negli anni 2007-2008 sono state eseguite le necroscopie di n°168 cinghiali pervenuti alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino.
Tra questi soggetti ne sono stati selezionati 63 dei quali sono stati prelevati i linfonodi sottomandibolari. I campioni con lesioni-simil tubercolari all'esame anatomo patologico sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS) per la ricerca di *Mycobacterium* spp.
Quattro campioni sono risultati positivi all'isolamento e all'identificazione su base genetica di Mycobacterium spp, di questi solamente due sono risultati positivi per la ricerca di DNA di Mycobacterium tuberculosis complex mediante Heminsted-PCR. L'identificazione su base genetica ha dato esito positivo per *Mycobacterium* spp per tutti e quattro i casi. Un solo campione è risultato positivo per *Mycobacterium avium*.
Scopo di questo contributo è di fornire un aggiornamento per gli anni 2007-2008 sull'incidenza della tubercolosi del cinghiale nella Regione Piemonte.

Abstract. A survey in the years 2007-2008 in Piedmont Region was carried out to evaluate the spread of the infection of *Mycobacterium* spp. in wild boar *(Sus scrofa)*.
One hundred sixty-eight wild boar were necropsied and gross tuberculous-like lesions were detected in 9 subjects.
Histopathological findings in 4 cases showed the typical tuberculous lesions characterized by a necrotic core, surrounded by a mixed population of inflammatory cells and separated from the normal parenchyma by a peripheral fibrous capsule.
All the samples with gross lesions were analysed. Isolates were obtained from 4 samples for *Mycobacterium* spp culture and identification. Only 2 cases were positive in Heminsted-PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex. Only one case was positive for *Mycobacterium* avium.

INTRODUZIONE

La tubercolosi, malattia ubiquitaria, è stata segnalata per la prima volta nel cinghiale all'inizio degli anni '30 del secolo scorso in Germania (Kindinger, 1934). Successivi studi hanno confermato la presenza dell'infezione anche nell'ex URSS (Starodinova, 1974), Bosnia-Erzego-

vina (Ivetic e Sudaric, 1987), Slovacchia (Kalenski, 1992), Germania (Kurtze, 1961; Schultz *et al.*, 1992), Australia (Letts, 1964; Corner *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1995), Nuova Zelanda (Ekdhal et al., 1970; Collins *et al.,* 1988), Hawaii (Essey *et al.*, 1983), California (Allison, 1967) ed Italia (Mignone *et al.*, 1991; Biolatti et al., 1992; Mignone *et al.*, 1996; Ferroglio e Rossi, 1996).
Il monitoraggio della tubercolosi negli animali selvatici è importante sia per i potenziali effetti che può avere su alcune popolazioni di animali selvatici, sia per le conseguenze che i serbatoi selvatici di micobatteri possono avere nei confronti degli animali allevati e dell'uomo.
Lo studio della diffusione della tubercolosi nel cinghiale è pertanto utile in quanto tale specie può svolgere il ruolo di reservoir e quindi di possibile fonte di contagio per i bovini al pascolo.
Scopo di questo contributo è di fornire un aggiornamento per gli anni 2007-2008 sulla diffusione della tubercolosi del cinghiale nella Regione Piemonte.

MATERIALI E METODI

Negli anni 2007-2008 sono state eseguite le necroscopie di n°168 cinghiali pervenuti alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino nell'ambito della convenzione attuata con la Regione Piemonte per la razionalizzazione ed integrazione delle attività di raccolta e smaltimento degli animali selvatici morti o oggetto di interventi di contenimento. Gli animali esaminati avevano un'età compresa tra 2 mesi e 5 anni. L'80% dei cinghiali è pervenuto alla Facoltà di Medicina Veterinaria in seguito ad investimento stradale, l'1% a causa di sequestri giudiziari per bracconaggio, la restante parte per ritrovamento casuale da parte del personale di vigilanza sul territorio piemontese.
Gli animali provenivano dalle province di Torino (n°60), Alessandria (n°48), Novara (n°11), Biella (n°6) e Cuneo (n°6). 37 soggetti sono invece giunti non accompagnati da verbali e pertanto non è stato possibile risalire al luogo di ritrovamento (Fig.1).

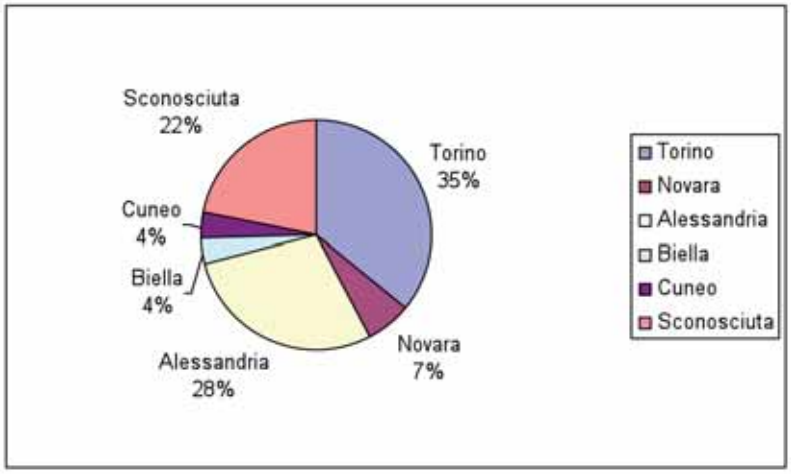


Fig. 1: Province di provenienza dei cinghiali.
Fig. 1: District of origin of wild boar.

Tra questi soggetti ne sono stati selezionati 63 (pari al 37,5%) dai quali sono stati prelevati i linfonodi sottomandibolari. I campioni con lesioni-simil tubercolari all'esame anatomo patologico sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS) per la ricerca di *Mycobacterium* spp.
Il campionamento è stato eseguito in maniera casuale in 54 soggetti. Nei restanti 9 soggetti erano invece state riscontrate lesioni simil-tubercolari a carico dei linfonodi stessi, dei polmoni e, in un caso, a livello paravertebrale cervicale.
I linfonodi sottomandibolari con assenza di lesioni sono stati prelevati ed immediatamente congelati per l'invio all'IZS.
Presso l'IZS sono state eseguite prove di isolamento ed identificazione, di ricerca di DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante Heminsted-PCR e l'identificazione su base genetica di *Mycobacterium*.
Nei 9 casi in cui è stato possibile individuare lesioni riferibili a tubercolosi è stata prelevata anche un'aliquota che è stata fissata in formalina tamponata al 10%.
I tessuti sono poi stati disidratati con una serie di passaggi in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti fino all'etanolo 100% e quindi in xilolo. In seguito ad inclusione in paraffina, da ciascun campione sono state tagliate al microtomo a slitta (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) sezioni dello spessore di 4-5µm. Le sezioni, per la successiva colorazione, sono state sparaffinate, colorate con Ematossilina-Eosina ed esaminate al microscopio ottico. E' stata inoltre eseguita la colorazione *Ziehl-Nielsen* per microorganismi acido-alcol resistenti.

RISULTATI

Quattro dei nove campioni inviati all'IZS per la presenza di lesioni simil-tubercolari sono risultati positivi all'isolamento e all'identificazione di *Mycobacterium spp*; di questi solamente due sono risultati positivi per la ricerca di DNA di *Mycobacterium* tuberculosis complex mediante Heminsted-PCR. L'identificazione su base genetica ha dato esito positivo per tutti e quattro i casi per Mycobacterium spp. Un solo caso è risultato positivo per *Mycobacterium avium.*

Fig. 2: Granuloma tubercolare in sede paravertebrale cervicale.
Fig. 2: Cervical paravertebral granuloma caused by Mycobacterium spp.

Tra i soggetti positivi uno aveva una età di 6-8 mesi, due soggetti 15-18 mesi ed un soggetto un'età superiore a 3 anni. Di questi, 3 provenivano dalla provincia di Torino e uno dalla provincia di Novara.
All'esame macroscopico va rilevato l'interessante riscontro di un granuloma tubercolare in sede paravertebrale cervicale (Fig. 2)
All'esame istologico sono stati osservati quadri compatibili con tubercolosi: lesioni granulomatose caratterizzate da necrosi, calcificazione e reazione epitelioide con presenza di cellule giganti.
La colorazione *Ziehl-Nielsen* non ha permesso di evidenziare la presenza dei micobatteri.
Una lesione simil-tubercolare, negativa alla ricerca per micobatteri, è risultata positiva per *Burkholderia cepacia*.

DISCUSSIONE

Su 168 cinghiali, solo 9 (pari al 5,4%) presentavano lesioni simil-tubercolari e di questi solo 4 casi (2,4%) sono risultati positivi per *Mycobacterium* spp.
Le lesioni riscontrabili nei suini e nei suidi selvatici possono avere localizzazioni diverse a seconda della porta d'ingresso del microorganismo. La maggior parte di tali lesioni si osserva a livello dei linfonodi mandibolari e retro-faringei (a seguito di infezione per via digerente), meno frequenti sono quelle dei linfonodi bronchiali e mediastinici (infezione per via respiratoria). Granulomi tubercolari a livello delle ossa, ed in particolar modo a livello vertebrale, sono invece relativamente frequenti durante la fase della generalizzazione ematogena. (Marcato, 2002)
Paragonando i metodi di indagine utilizzati è importante sottolineare che l'osservazione in sede necroscopica delle lesioni riveste un ruolo importante per individuare soggetti potenzialmente affetti da tubercolosi. La colorazione di *Ziehl-Nielsen*, sebbene poco costosa, (Zanella *et* al., 2008) è poco sensibile, mentre la ricerca del DNA di *Mycobacterium* tuberculosis complex mediante Heminsted-PCR è una metodica sensibile e specifica, sebbene più costosa. Nonostante ciò, Hènault et al. (2006) hanno dimostrato che la metodica PCR per la ricerca di tubercolosi negli animali selvatici è del 18,5% meno sensibile rispetto all'esame colturale e all'isolamento.
Sebbene le percentuali di positività per *Mycobacterium* spp. siano molto basse in Regione Piemonte, continua ad essere importante il monitoraggio degli animali selvatici per chiarirne la diffusione, monitorare il trend della malattia nel tempo nei cinghiali e per chiarire il loro ruolo epidemiologico nei confronti degli altri animali selvatici, degli animali allevati e dell'uomo (Zanella *et* al., 2008).
Studi condotti in Spagna hanno dimostrato l'importanza della ricerca di tubercolosi nei cinghiali poiché capaci di mantenere l'infezione e pertanto in grado di trasmettere la malattia ad altre specie, svolgendo quindi il ruolo di reservoir selvatico. Appare pertanto evidente la necessità di un accurato controllo della presenza di tale infezione nelle popolazioni di cinghiali nel quadro delle misure di profilassi ed eradicazione della malattia (Naranjo, 2008)

Bibliografia

Allison, M.M. (1967) "Annual report", Calif. District U.S. Bur. Sport Fish. Wildl. Div.

Biolatti B., Bollo E., Mignone W., Caramelli M., Schröder C. (1992) "Tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Liguria (Italy)" In: Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 34 Internationalen Symposium uber die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain 1992, 55-59.

Co D.O., Hogan L.H., Kim S.I., Sandor M. (2004) "*Mycobacterial granulomas:* keys to a long-lasting host–pathogen relationship." Clin. Immunol. 13, 130–6.

Collins D.M., Gabric D.M., De Lisle G.W. (1988) "*Typing of Mycobacterium bovis* isolates from cattle and other animals in the same locality." New Zealand Veterinary Journal, 36, 45-46.

Corner L.A., Barrett R.H., Lepper A.W.D., Lewis V., Pearson C.W. (1981) "A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory." Australian Veterinary Journal, 57, 537-542.

Ekdahl M.O., Smith B.L., Money D.F.L. (1970) "Tuberculosis in some wild and feral animals in New Zealand." New Zealand Veterinary Journal, 18, 44-45.

Essey M.A., Stallknecht D.E., Himes E.M., Harris S.K. (1983) "Follow-up survey of feral swine for *Mycobacterium bovis* infection on the Hawaiian island of Molokai." Proceedings of the U.S.Animal Health Association Meeting, 87, 589-595.

Ferroglio E.M., Rossi L. (1996) "Brevi note informative sulla tubercolosi nel cinghiale ed in altri mammiferi selvatici." Medicina Veterinaria Preventiva, 12, 8-9.

Henault S., Karoui C., Boschiroli M. L. (2006) "A PCR based method for tuberculosis detection in wildlife." In: Vannier P., Espeseth D. "New diagnostic technology: Applications in animal health biological and controls. Developments in biologicals." Karger, Basel, Switzerland, 123–132.

Ivetic V., Sudaric F. (1987) "Pearly tuberculosis ("perlsucht") in wild boar" Veterinaria Yugoslavia, 36, 121-125.

Kalensky P. (1992) "Isolation of Mycobacteria from wild boar" Veterinarstvi, 42, 346-347.

Kindinger H. (1934) "Tuberculose beim Wild in freier Wildbahn." Vet. Med. Dissertation Giessen.

Kurtze H. (1961) "Reinfektion tuberkulosefreier Rinderbestände durch tuberkulöses Wild" Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 68, 442-443.

Letts G.A. (1964) "Feral animals in the Northern Territory." Australian Veterinary Journal, 40, 84-88.

Marcato P.S. (2002) “Sistema respiratorio” In: Marcato P.S. “Patologia sistematica Veterinaria”, 1° ed., Bologna, Edagricole, 569-571.

Martín-Hernando M.P., Höfle U., Vicente J., Ruiz-Fons F., Vidal D., Barral M., Garrido J.M., De la Fuente J., Gortazar C. (2007) "Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar.” Tuberculosis 87, (4), 360-7.

Mcinerney J., Small K.J., Caley P. (1995) “Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory.” Australian Veterinary Journal, 72, 448-451.

Mignone W., Ercolini C., Fisichella S., Dondo A.(1991) “Osservazioni preliminari su alcuni episodi di tubercolosi nel cinghiale (*Sus scrofa*).” Selezione Veterinaria, 32, 843-849.

Mignone W., Dini V., Bollo E., Ganduglia S., Ferraro G., Becchi R., Poggi M. (1996) “Monitoraggio della tubercolosi nei cinghiali a vita libera: esperienze in provincia di Imperia e di Savona” In: Atti del Convegno nazionale: Ecopatologia della fauna selvatica (Bologna 15-17 dicembre 1994), Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina, XXIV, 619-629.

Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. (2008) “Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex.” Veterinary Microbiology 127, (1-2), 1-9.

Schultz G., Deuter H., Dedek J. (1992) “Zur Vorkommen von *Mycobacterium bovis* Infektionen beim freilebenden Schwarzwild Erkrankungen der Zootiere”. In: Verhandlungsbericht des 34 Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain, 51-53.

Starodinova A.K. (1974) “Lokalisation und Erscheinungsformen der Tuberkulose bei Wildschweinen” in: Briedermann L. “Schwarzwild” Neumann-Neudamm, 539.

Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Fermé M., Karoui C., Boschiroli M.L. (2008) “*Mycobacterium bovis* in wildlife in France” Journal of Wildlife Diseases, 44, (1), 99–108.

ACIDI ORGANICI PROTETTI PER IL CONTROLLO DELLA SALMONELLA NEI SUINI.

TARGET RELEASE ACID CONCEPT TO CONTROL SALMONELLA INFECTION IN PIGS.

SCHWARZER K., MAFFEZZOLI D.
INVE NUTRI-AD, KASTERLEE, BELGIUM

Parole chiave: Salmonella Typhimurium, Acidi grassi a corta catena (SCFA) , Sodio butirrato
Key words: Salmonella Typhimurium, Short chain fatty acids (SCFA), Sodium butyrate

Riassunto. Se è voluto approfondire e verificare in una sperimetazione di campo, l'effetto che gli SCFA
hanno dimostrato di avere nel ridurre l'invasività della Salmonella Typhimurium nel suino.Per monitorare lo stato sanitario dell'allevamento è stato utilizzato il test ELISA per la Salmonella e i valori sono stati espressi con il rapporto S/P .
Il gruppo di suini trattato con una miscela di acidi (3 kg\ton), butirrico, propionico e sorbico in forma protetta, al termine della prova avevano valori sierologici di S/P mediamente inferiori al gruppo non trattato con gli acidi in forma protetta.

Summary. We have done a field trial to test the efficacy of SCFA to avoid Salmonella Typhimurium
invasion in pigs. For serological analysis has been used the ELISA test for Salmonella end the value
express on S/P ratio to control the herd.
Pigs supplemented with a mix of coated acids (3 kg\ton), butyric, propionic and sorbic have shown an average of S/P ratio value lower than the herd not treated with coated acids.

INTRODUZIONE

La salmonellosi nell'allevamento suino rimane una patologia di rilievo, specialmente in funzione del rischio di trasmissione all'uomo attraverso i prodotti derivati. Le carni avicole e le uova sono considerate la principale causa di salmonellosi in campo umano, ma tuttavia non possiamo sottovalutare il rischio proveniente anche dalle carni suine.

La Salmonella spp. è in grado di sopravvivere alla barriera gastrica e pertanto superare lo stomaco e raggiungere il tratto intestinale (Kwon,Y. M. et al, 1998).
La trasmissione della Salmonella nei suini avviene principalmente attraverso la via orale. La cavità orale è il primo luogo di contatto tra la Salmonella e l'ospite. La Salmonella è spesso localizzata a livello tonsillare, dove può sopravvivere per lungo tempo. La parte distale del piccolo intestino insieme con colon e ceco sono i luoghi favoriti per la colonizzazione del tratto intestinale.

Entro due ore dopo l' infezione orale, la Salmonella è gia riscontrabile all'interno degli enterociti e a livello dei linfonodi mesenterici (Volf J, 2008).
Un passo importante nella patogenesi della salmonellosi è il processo di invasione delle cellule epiteliali intestinali (Dibb-Fuller et al. 1999). La Salmonella può essere bloccata per fagocitosi da queste cellule (Barrow et al, 1999).

Gli Acidi grassi a corta catena (SCFA) e gli acidi grassi a media catena (MCFA) sono largamente utilizzati nei mangimi e nell'acqua per il controllo dei batteri patogeni. Pertanto è stato studiato l'effetto che questi acidi hanno sul grado di invasività della Salmonella e come in presenza di SCFA e MCFA il grado di virulenza della Salmonella Typhimurium venga attenuato (Gantois, et al 2006).
La percentuale di invasione cellulare della Salmonella Typhimurium, usando linee cellulari intestinali di suino IPI-2I coltivate in presenza di SCFA e MCFA si è ridotta in presenza di questi acidi (Mahu et al, 2006).
Il modello "in vitro" ha dimostrato l'influenza esercitata da questi acidi.
Pertanto l'acido butirrico (un SCFA) e l'acido caprilico (un MCFA) sono stati protetti mediante una matrice lipidica di origine vegetale per garantire un lento rilascio di questi acidi anche nella parte più distale del tratto intestinale.
Un esperimento "in vivo" con suini, mostra che utilizzando del butirrato protetto si ottiene una riduzione della diffusione della Salmonella Typhimurium di dieci volte superiore rispetto all'acido caprilico protetto (MCFA).
Il butirrato ed in parte anche l'acido caprilico, riducono la colonizzazione dell'intestino del suino (Lardon et al, 2006).

Per poter effettuare una prova di campo abbiamo identificato un allevamento con problemi di Salmonellosi.

MATERIALI E METODI

La prova di campo è stata effettuata in Belgio e l'allevamento a ciclo chiuso oggetto della prova è stato scelto tra un elenco di allevamenti monitorati per il rischio salmonellosi dall' istituto DGZ (Dierengezondheidszorg) .
L'allevamento in questione, da analisi sierologia ELISA a campione su suini di diverso peso, era risultato sieropositivo con valori di S/P > 0,6.
La prova di campo prevedeva un gruppo di controllo senza acidi ed un gruppo a cui tramite il mangime veniva somministrato 3kg\ton di una miscela di acidi protetti composta da Sodio butirrato, acido propionico ed acido sorbico. Non è stato aggiunto nessun altro acido nel mangime o nell'acqua di abbeverata.
I gruppi di controllo e quelli trattati sono stati divisi random dopo lo svezzamento e disposti in capannoni separati accuratamente puliti e disinfettati.
La somministrazione del mix di acidi protetti tramite mangime è iniziata a Luglio 2007 e si è protratta per sei mesi.
Il prelievo di sangue veniva effettuato sul 10 % dei suini di ogni gruppo (accrescimento-magronaggio-ingrasso). L'analisa ELISA per Salmonella e determinazione del valore S/P è stata eseguita da DGZ.

RISULTATI

I risultati ottenuti nel corso della prova sono stati riportati nelle tabelle allegate: nella tabella 1 sono stati riportati i valori del rapporto S/P ELISA dell'allevamento prima che iniziasse il trattamento con gli acidi protetti. In tabella 2 invece i valori di S/P ELISA dei suini trattati ed in tabella 3 i suini del gruppo di controllo negativo.

Tabella1. Risultati degli esami sierologici (ELISA per Salmonella) prima della prova
Table 1. Results of the serological tests (ELISA for Salmonella) before trial

Data analisi	16/06/2006	5/12/2006	21/05/2007
S/P valori medi	0,71	0,66	0,83

Tabella 2.Risultati degli esami sierologici (ELISA per Salmonella) dopo tre mesi di trattamento
Table 2. Results of the serological test (ELISA for Salmonella) after three months of tritment

Numero suini	100 kg	60 kg	40 kg
1	0,26	0,02	0,02
2	0,57	0,02	0,06
3	0,94	0,13	0
4	0,29	1,08	0
5	0,33	0	0
6	0,47	0	0
7	0,19	0	0,13
8	0,08	0,01	0,01
9	0,19	0,17	0,15
10	0,06	0,06	0
S/P media	0,34	0,15	0,04

Tabella 3. Risultati degli esami sierologici (ELISA per Salmonella) gruppo di controllo negativo (senza acidi)
Table 3. Results of the serological test (ELISA for Salmonella) negative control group (without acids)

Numero suini	100 kg	60 kg	40 kg
1	1,96	1,59	0,22
2	1,03	1,79	0,2
3	2,39	1,31	0,05
4	0,38	0,37	0,01
S/P media	1,44	1,26	0,12

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il gruppo di suini trattato con il mix di acidi organici protetti addizionati al mangime aveva valori di S/P inferiori rispetto al gruppo di suini non trattato dopo tre mesi di applicazione.
I valori medi di S/P dei suini trattati si sono abbassati se confrontati con i valori riferiti ad analisi sierologiche effettuate prima dell'inizio della prova.

La contaminazione dei suini con la Salmonella si verifica attraverso l'apparato digerente.
La chiave che ci permette di controllare la contaminazione da Salmonella nei suini è quella di evitare la penetrazione dei patogeni all'interno degli enterociti.
L'uso di acidi incapsulati permette di fare raggiungere le molecole attive degli acidi anche nella parte più distale dell'intestino.
Gli SCFA grazie alle loro proprietà anti-batteriche, nella loro forma libera sono già attivi nel mangime fino allo stomaco, ma grazie alla tecnologia di protezione con grassi è possibile fare arrivare gli SCFA ed in particolare il butirrato nel grosso intestino riducendo così l'adesione e l'invasione della Salmonella.
Il mangime supplementato con una appropriata miscela di SCFA può essere la via per controllare la Salmonellosi nel suino.

Bibliografia:

Dibb-Fuller et al (1999). Fimbriae and flagella-mediated association and invasion of cultures epithelial cells by Salmonella Enteritidis. Microbiology, 145, 1023-1031

Gantois et al. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD Salmonella vac(®) and TAD Salmonella vac (®) T reduces internal egg contamination with Salmonella Enteritidis, Vet Microbiology, 2006 Apr 25

Kwon Y.M., et al. (1998). Induction of acid resistance of Salmonella Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. Applied and Environmental Microbiology, 64, 3458-3463.

Lardon, I et al. The influence of fatty acids on the expression of virulence genes of Salmonella Typhimurium end the colonization of pigs, Vet Microbiology, 2006

Mahu M. et al. Short and medium-chain fatty acids influence Salmonella Typhimurium virulence gene expression, IPVS Congres, Kopenhagen (DK), 16-19 Juli 2006.

Volf J. et al. Recent insight in the pathogenis of Salmonella infection in pigs, first Belgium Symposium on Salmonella Research and control in pigs, 2008.

INFLUENZA DI UNA DIETA INTEGRATA CON SEMI DI LINO ESTRUSI SU ALCUNI PARAMETRI ZOOTECNICI, METABOLICI ED IMMUNOLOGICI IN SUINI ALL'INGRASSO

INFLUENCE OF AN ESTRUDED LINSEEDS INCLUSION DIET ON SOME ZOOTECHNICAL, METABOLIC AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN FINISHING PIGS

MARCO SENSI [1], LIVIA MOSCATI [1], LORENZO BATTISTACCI [1], MASSIMILIANO GAMBONI [2], MIRIAM TINARO [1], MASSIMO TRABALZA MARINUCCI [3], CLARITA CAVALLUCCI [2]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia*
[2]*Veterinario Libero Professionista;*
[3]*Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria Università degli Studi di Perugia;*

Parole chiave: Suini, PUFA, Alimentazione

Key words: Pigs, PUFA; Nutrition

Riassunto. L' impiego di diete ad elevata concentrazione di acidi grassi della serie n-3 sembra essere in grado di influenzare la risposta immunitaria dell'animale.
La riduzione dei fattori stressanti all'interno delle aziende zootecniche è uno degli obiettivi che le recenti disposizioni legislative comunitarie impongono in maniera sempre più decisa. L'utilizzazione di fonti alimentari ricche di omega-3 è in grado di influenzare il metabolismo lipidico ed indirettamente i meccanismi di risposta immunitaria specifica e soprattutto aspecifica. Con questo lavoro si sono valutati gli effetti dell'apporto di semi di lino estrusi, nella dieta di suini all'ingrasso, su alcuni parametri zootecnici, metabolici, immunologici e produttivi.

Summary. Fat acids highly added diets are able to positively influence animal's immune response. Stress reduction within animal farms is one of the European Community targets, always more emphasized. Nutritional omega-3 sources can influence lipidic metabolism, specific and mainly natural immune response. Aim of this work was to evaluate the effects of an inclusion of estruded linseeds on some zootechnical, metabolic, immune and productive parameters of finishing pigs.

INTRODUZIONE

Il consumatore risponde positivamente all'offerta di un prodotto che non è soltanto sicuro dal punto di vista igienico - sanitario, ma che si distingue anche per caratteristiche quali il valore nutritivo, il basso contenuto in lipidi, il rapporto fra acidi grassi saturi ed insaturi e il ridotto contenuto in colesterolo.
In tale contesto, tra i risultati di maggiore interesse per la salute umana, è stato dimostrato che i prodotti carne e latte provenienti da animali alimentati al pascolo, o la cui dieta sia stata integrata da semi di oleaginose quali il lino o la colza, contengono una concentrazione di acidi grassi (AAGG) insaturi della famiglia degli omega-3 e CLA (aci-

di linoleici coniugati) molto maggiore rispetto ad animali alimentati con foraggi secchi e concentrati. Le oleaginose in particolare sono state studiate per l'effetto che il contenuto di AAGG esercita sulle caratteristiche nutrizionali della carne(5). In particolare, alcune di esse sarebbero in grado di conferire alla carne un contenuto elevato di AAGG polinsaturi (PUFA) caratterizzati da un favorevole rapporto omega-6:omega-3.
Quest'ultimo parametro riveste un'elevata importanza per la salute umana, in riferimento soprattutto alla prevenzione delle malattie cardiovascolari e agli effetti mediati sulla risposta immunitaria, specialmente nel caso delle malattie croniche. La presenza di questi acidi nella dieta è stata anche collegata ad effetti antitumorali nell'uomo.
Nell'ambito delle produzioni avicole è stato dimostrato come la sostituzione dei grassi animali con la colza è in grado di aumentare la quota di PUFA e diminuire quella relativa al colesterolo in broiler macellati a 39 gg. Da studi condotti è risultato che l'impiego di semi integrali di lino (3) e di colza in quantità pari al 12% della dieta determina sia un maggior accrescimento dei soggetti che un incremento del contenuto di AAGG della serie n-3 della dieta.
E' importante infine ricordare che l'impiego di diete ad elevata concentrazione in AAGG della serie n-3 è in grado di influenzare positivamente la risposta immunitaria dell'animale. La riduzione dei fattori stressanti negli allevamenti zootecnici è un obiettivo che le nuove disposizioni legislative in ambito nazionale e comunitario impongono in maniera sempre più decisa; ciò oltre a riflettersi sulle condizioni di salute degli animali, gioca un ruolo importante e insostituibile nel più ampio contesto del benessere animale. L'impiego di fonti alimentari ricche di omega-3 è in grado di migliorare lo stato di benessere dell'animale con azione indiretta sui meccanismi di risposta immunitaria specifica e soprattutto aspecifica.
Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare in suini all'ingrasso l'influenza di una dieta, integrata con semi di lino estruso, rispetto ad un gruppo controllo non integrato, su alcuni parametri zootecnici, metabolici, immunologici e produttivi.

MATERIALI E METODI

Si è operato all'interno dell'allevamento da ingrasso a ciclo continuo situato in provincia di Perugia.
Sessantaquattro suini, del peso medio di circa kg 63, sono stati sottoposti, al momento dell'arrivo in azienda, al rilevamento del peso vivo ed al prelievo ematico dalla vena giugulare (tempo 0) ed i risultati chimico clinici ottenuti sono stati cumulativamente riassunti nella tabella 1.
E' stata, quindi, effettuata la loro suddivisione in quattro gruppi: 1. Controllo Razionato, 2. Trattato Razionato, 3. Controllo ad libitum, 4. Trattato ad libitum), in base alla tipologia di mangime ("con" o "senza" integrazione di semi di lino al 2%) ed al sistema alimentare ("razionato" e "ad libitum").
Gli animali sono stati inoltre pesati al T1 (60 giorni dopo l'arrivo) al T2 (150 gg dopo l'arrivo) e al T3 (momento della macellazione). In questi stessi momenti sono stati effettuati prelievi ematici allo scopo di valutare alcuni parametri di immunità aspecifica (battericidia, complemento e lisozima), così come i Metaboliti Reattivi all'Ossigeno (ROMs), il Potere Antiossidante del siero (PAO) ed i livelli ematici di Colesterolo e Trigliceridi.

In sede di macellazione è stato misurato anche lo spessore del grasso dorsale, sulla mezzena, appena dietro l'ultima vertebra toracica.
Il mangime sperimentale è stato prodotto utilizzando seme di lino macinato, sottoposto ad una particolare estrusione che ha avuto come risultato la distruzione dei fattori cianogeni del Lino (HCN < 10 mg/kg di seme), la liberazione controllata degli oli (80% >Materia Grassa libera / Materia Grassa totale > 75%), l'inattivazione delle lipasi (meq O2 >20 mg / kg di Materia Grassa) e la preservazione del profilo lipidico dei semi (C18 :3 n-3 > 230g/ kg Sostanza Secca).
Sui campioni di siero sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- La titolazione del lisozima serico è stata eseguita secondo la metodica di Osserman (7). La concentrazione viene espressa in µg/ml.
- L'attività battericidica del siero è stata saggiata mettendo in coltura il siero in esame con ceppi di E. coli (2) e valutando poi l'inibizione della crescita del ceppo, tramite spettrofotometro - a 690 nm (6) . La sua concentrazione viene espressa in %.
- La titolazione semiquantitativa del complemento si basa sulla quantificazione dell'attività litica del siero, utilizzando la via classica di attivazione del complemento (1). La sua concentrazione viene espressa in CH50.
- ROMs e PAO sono stati misurati nel siero tramite due kits commerciali (Diacron, Italy). Nel test per la determinazione dei ROMs una piccola quantità di siero viene diluita in un tampone acido; in questo modo gli ioni di ferro legati alle proteine sieriche vengono resi disponibili e possono catalizzare, in vitro, la rottura dei Roms e la formazione di radicali perossilici ed alcolici. L'aggiunta di un cromogeno svela questa reazione e la lettura della variazione di colore viene effettuata tramite fotometro (lunghezza d'onda di 505 o 546 nm). Il test di misurazione dei PAO permette di valutare, per via indiretta, l'efficacia dei sistemi antiossidanti ematici (9); anche in questo caso la lettura viene effettuata per via spettrofotometrica (lunghezza d'onda di 505 o 546 nm).

- La determinazione della concentrazione di colesterolo ematico e dei trigliceridi è stata effettuata impiegando reagenti e metodiche della Randox (CH n.7945) ed analizzatore automatico (Hitachi 704).

- La misurazione dello spessore del grasso dorsale è stata effettuata con calibro.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante procedura GLM del SAS (2001).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Al momento dell'arrivo in azienda gli animali presentavano una leggera sindrome respiratoria, caratterizzata da starnuti e qualche colpo di tosse, con remissione completa dei sintomi dopo circa dieci giorni.
Questo fatto potrebbe giustificare il basso valore medio della Battericidia (<40 %) ed il modico innalzamento del valore del lisozima (Tab.1), quali espressioni di un processo infiammatorio in atto (8).

Tabella 1. Valori di alcuni parametri evidenziati alla data di inizio della sperimentazione
Table 1. Start trial parameters values

Parametro	Valori di Riferimento	Valore ottenuto
Battericidia	> 40 %	31.64 ± 1.53
Lisozima	>1 <3 µg/ml	4.03 ± 0.26
Complemento	> 80 CH50	82.48 ± 2.40
ROMs	25,6 ± 1 Mmol H2O2	45.33 ± 1.21
PAO	471 ± 13 µM HClO	266.42 ± 7.33
Colesterolo	0,62 – 1,25 mmol/l	1.84 ± 0.04
Trigliceridi	0,2 – 0,6 mmol/l	0.31 ± 0.02

Le performance zootecniche ottenute, dimostrano chiaramente come i due gruppi di animali, alimentati "a volontà" (ad libitum), abbiano avuto accrescimenti giornalieri significativamente migliori rispetto a quelli "razionati". Contestualmente e a dispetto di quanto si poteva ipotizzare, lo spessore medio del grasso dorsale, dei soggetti "ad libitum" è stato marcatamente inferiore rispetto ai suini "razionati" (tabella 2). Questo fatto sembra confermare come il frazionamento del quantitativo alimentare giornaliero conduca ad una significativa riduzione dell' "indice di massa corporea" (stima dell'adiposità), come già dimostrato nella specie umana.

Tabella 2. Suini in prova , peso vivo e spessore del grasso dorsale
Table 2. Numbers of pigs, live weight and backfat depth

	Gruppo "ad lib"		Gruppo "razionato"	
	Controllo (3)	Trattati (4)	Controllo (1)	Trattati (2)
Numero suini in prova	17	16	16	15
Peso medio inizio prova (Kg)	62,70	60,88	64,11	64,40
Peso medio macellazione (Kg)	189,4	190,4	185,92	178,66
Peso medio mac. (Kg) "ad lib" vs "razionato"	**189,69**		**182,42**	
Spessore grasso dorsale (P2)	3,18	3,19	3,70	3,32
Spessore grasso dorsale (P2) "ad lib" vs "razionato"	3,187		3,52	

Dal punto di vista "sanitario", i suini alimentati "a razione", due volte al giorno, hanno evidenziato valori significativamente inferiori a quelli "ad libitum" per ciò che concerne il potere battericida ed il Potere Antiossidante (PAO) del loro siero.
Questo risultato suggerisce la ragionevole ipotesi che soggetti costretti a "combattere" per soddisfare il loro corretto fabbisogno alimentare giornaliero siano sottoposti ad un ragionevole "stress" che può indebolirne le difese immunitarie naturali.
D'altra parte i gruppi alimentati "a volontà" hanno presentato livelli ematici di colesterolo e trigliceridi significativamente superiori ai "razionati" (tabella 3).

Tabella 3. Effetto del sistema di alimentazione sulla variabilità di alcuni parametri di suini in accrescimento (medie stimate ± ES)

Table 3. Feeding system influence on some parameters of growing pigs (e. aw. ± SE)

Parametro	"ad libitum"	"razionato"	P
Battericidia	43,63 ±1.67	37.66 ± 1,74	<0,05
Lisozima	3.78 ± 0,23	4.39 ± 0,24	
Complemento	62.02 ± 2,46	56.88 ± 2,56	
ROMs	48.49 ± 1,06	48.28 ± 1,10	
PAO	229.32 ± 6,50	173.44 ± 6,77	<0.001
Colesterolo	2.60 ± 0,04	2.34 ± 0,04	<0.001
Trigliceridi	0.71 ± 0,03	0.58 ± 0,03	<0.001

Sebbene la percentuale di semi di lino fosse bassa (2 %), sembrerebbe, comunque, avere determinato un abbassamento significativo del tasso di colesterolo ematico (tabella 4). Contestualmente, e come era d'altronde prevedibile, si è avuto un aumento dei radicali liberi ed una diminuzione del potere antiossidante del siero.
Ciò sta ad indicare che nel momento in cui si fornisce all'animale una dieta arricchita di omega-3, sarebbe opportuno che questa venisse integrata con sostanze con potere antiossidante, come selenio e vitamina E.

Tabella 4. Effetto dell'inclusione di semi di lino estrusi sulla variabilità di alcuni parametri di suini in accrescimento (medie stimate ± ES)

Table 4. Effect of estruded linseed inclusion on some parameters variability in growing pigs (e. aw. ± SE)

Parametro	Controllo	"Lino estruso"	P
Battericidia	41.10 ± 1.63	40.19± 1.79	
Lisozima	4.08± 0.22	4.09± 0.25	
Complemento	60.8±2.39	58.08 ± 2.62	
ROMs	46.07 ± 1.03	50.69 ±1.13	<0.05
PAO	214.04±6.32	188.72±6.93	<0.05
Colesterolo	2.58±0.04	2.36±0.04	<0.001
Trigliceridi	0.64±0.03	0.65±0.03	

CONCLUSIONI

Il colesterolo è un costituente essenziale delle cellule animali ed è contenuto in tutti gli alimenti di origine animale. La scoperta del nesso esistente tra colesterolo ematico e malattie cardiovascolari e la possibilità, avanzata da alcuni, che il colesterolo alimentare abbia effetti sul livello di colesterolo nel sangue, ha stimolato le indagini volte a stabilire il contenuto di colesterolo nei vari tipi di carni. I dati bibliografici più recenti fanno comunque notare che la carne di suino è quella con il contenuto di colesterolo più basso. Riscontri importanti sono, invece, quelli relativi alle differenze indotte dal tipo di

muscolo e dal contenuto di grasso intramuscolare o di copertura.
Gli omega-3, noti già da tempo per i loro effetti benefici sulla salute umana (4), sono acidi grassi polinsaturi (PUFA) che riescono a ridurre alcuni stati infiammatori dell'organismo e sono efficaci contro coliti, gastriti, tendiniti.
Gli acidi grassi della serie omega-3 producono una riduzione dei livelli di colesterolo ematico e, quindi, del rischio cardiovascolare, favoriscono la vitalità delle cellule del sistema nervoso centrale, hanno funzione anticancerogena ed aumentano le difese immunitarie. Pertanto, l'alimentazione con mangimi che hanno nutrienti più ricchi di '*molecole biologicamente attive*' trasferibili *'in toto*' o 'in parte' al prodotto finito, sono sicuramente da preferire.

Bibliografia

1. Barta V., Barta O. (1993) "Testing of Hemolitic Complement and its components" In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA

2. Dorn W., Mehl G., Clem CHR, (1980) Untersuchungen zur serumbakterizidie beim Kalb. Arch. Exper. Vet. Med. 34, 635- 650

3. Eastwood L., Kish P., Patience J.F. and Leterme P., (2008)"Growth performance and carcass fatty acid profile of pigs fed flaxseed meal" , Advances in Pork Production, vol. Abstract#15;

4. Katan MB, Zock PL, Mensink PR. "Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease". Am J Clin Nutr 1995; 61 (suppl):1370S-71S;

5. Matthews K.R., Homer D.B., Thies F. and Calde P.C..(2000), "Effect of whole linseed (Linum inusitatissimum) in the diet of finishing pigs on growth performance and on the quality and fatty acid composition of various tissues", British Journal of Nutrition, 83, 637-643;

6. Moscati L., Stelletta C., Sensi M., Sonaglia L., Battistacci L. (2003) "Studio di alcuni parametri immunologici per la valutazione dello stato di benessere nell'allevamento del suino all'ingrasso" Atti V° Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Pisa 20- 21 novembre, 103-104

7. Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966) "Serum and urinary lisozime (muramidase) in monocytic and monomyelociticleukemia" J. Exp. Med. 124, 921- 952

8. 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. in: Proc. 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 1, 287.

9. Tse H.M., Milton M.J., Piganelli J.D., 2004. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation–reduction reactions in innate immunity. Free Rad. Biol. Med., 36, 233-247.

EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE DEI SUINETTI VERSO PCV2 IN ALLEVAMENTI CON MALATTIA DA CIRCOVIRUS (PCVD)

EFFICACY OF PCV2 VACCINATION IN PIGLETS TO CONTROL PCVD

TERRENI MARCO*, CALEFFI ANTONIO*, ARIOLI ELENA, CERATI CARLO**, BENAGLIA PAOLO**, GAMBA FAUSTO**, PERSICO FABIO***, MARTELLI PAOLO******

** Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica*
*** Medico Veterinario – GVS- Mantova*
**** Medico Veterinario - Savona*
***** Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma*

Riassunto: La malattia da circovirus (PCVD) è responsabile di elevate perdite economiche per gli allevamenti colpiti. I danni causati dalla PCVD sono legati agli effetti di dell'infezione da PCV2 sul sistema immunitario. Questo studio è volto a verificare gli effetti della vaccinazione dei suinetti con vaccino spento a subunità contenente l'ORF2 di PCV2 in termini di riduzione della mortalità e della percentuale di scarti nonché di miglioramento della performance produttiva, in allevamenti italiani che presentavano forme diverse inquadrabili nell'ambito della PCVD. Lo studio è stato condotto in 4 allevamenti caratterizzati da differenti tipologie gestionali, multisede o sito unico, e consistenza numerica. Tutte le aziende producevano suino pesante ed i dati sono stato raccolti dallo svezzamento alla prima fase di permanenza in ingrasso. In tutti gli allevamenti inclusi nello studio, i gruppi vaccinati hanno presentato un notevole miglioramento dei parametri sanitari e della performance di crescita rispetto ai controlli. Nelle aziende con PCVD acuta la riduzione della mortalità e degli scarti, successivamente alla viremia da PCV2, è stata costantemente registrata raggiungendo anche valori di decremento pari al 75%. Analogamente ai miglioramenti osservati a carico dei parametri sanitari, in tutti i gruppi vaccinati sono stati dimostrati incrementi ponderali giornalieri superiori (da 17 a 38g). Anche in presenza di co-infezioni occorse durante lo studio (APP, PRRSv+S. suis) la vaccinazione dei suinetti è stata efficace e ha assicurato una migliore performance generale.

Summary: Porcine Circovirus Disease (PCVD) is responsible of significant economic losses for the affected farms. The disease has different forms, acute, moderate and mild. The clinical expression and the related damages are the effect of PCV2 on the immune system. The objective of this study was to evaluate the effect of a sub-unit ORF2 inactivated vaccine, administered in piglets, in reducing mortality, runts and increasing ADG , in Italian swine farms. Four herds, different for production system, suffering from different forms of PCVD, have been included in the study. Data presented in this study consider the evaluation of vaccination from weaning to the first weeks in the finishing section. Vaccinated pigs had a strong reduction in mortality and runts rate, as well as an improvement of the ADWG. These

results have been observed in different PCVD clinical forms and herd operations. The decrease of the overall mortality and runts rate have been very high, peaking at 75%. At the same time a better ADG was recorded in all the vaccinated groups (17g to 38g/die). The presence of co-infections (PRRSv+ S. suis, and APP) contribute to increase the overall mortality and runts rate: the efficacy of vaccination with the sub-unit ORF2 vaccine in piglets is confirmed even in this scenario.

Parole chiave: *PCVD, vaccinazione suinetti, efficacia.*

Key words: *PCVD, piglet vaccination, efficacy*

INTRODUZIONE

Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è da tempo inserito tra gli agenti eziologici responsabili di gravi danni economici per gli allevamenti di suini di tutto il mondo. La sua prima segnalazione risale agli ultimi anni del secolo scorso, quando il virus è stato riconosciuto come condizione indispensabile per l'espressione della PMWS (Post Weaning Multisysteic Wasting Syndorme) (1-2). Questa sindrome descritta per la prima volta nel 1996 (16) in Canada colpisce solitamente i suini di età compresa tra le 5 e le 15 settimane ed è caratterizzata da un elevato aumento della mortalità, deperimento, aumento di dimensione dei linfonodi, presenza di sintomi respiratori e, più raramente, anemia, ittero e diarrea, nei suini nel post-svezzamento.
In condizioni di campo sono costantemente individuate situazioni microbiologiche complesse, ovvero infezioni multiple che vedono il coinvolgimento anche di altri virus. In particolare si segnalano infezioni associate tra PCV2 e virus della Malattia di Aujeszky, PCV2 e Parvovirus e, assai frequentemente, tra PCV2 e PRRSv presente il più del 60% dei casi di PMWS (3). I connotati eziologici della PMWS assumono una maggiore complessità dal momento che, nel corso di un focolaio della sindrome, i reperti microbiologici sono arricchiti dalla dimostrazione della presenza degli agenti batterici di frequente riscontro in corso di malattia respiratoria (*Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Streptococcus suis, Bordetella bronchiseptica, ed altri*). La PMWS è stata successivamente segnalata, a cavallo tra gli ultimi anni del 90 e i primi del nuovo secolo in molti Paesi, tra cui anche l'Italia (5,4). In Canada e Nord-America, alle prime descrizioni del 1996 è seguita una fase di presenza sporadica della sindrome fino al 2004. A partire dal 2005-2006 la PMWS è ricomparsa, con quadri di assoluta gravità, soprattutto a carico di suini magroni e grassi.
Anche se la malattia può considerarsi relativamente recente, il virus non lo è: indagini retrospettive hanno consentito di evidenziare PCV2 in campioni che datano oltre 30 anni (6). PCV2 è stato associato anche ad altre patologie quali il complesso respiratorio del suino (PRDC), la sindrome dermatite-nefrite (PDNS) e la polmonite proliferativa necrotizzante del suino (PNP), problematiche riproduttive, enterite granulomatosa, epidermide essudativa ed epatite (14, 17-19). L'insieme delle patologie in cui PCV2 è coinvolto è oggi riunito nell'acronimo PCVD (Porcine CircoVirus Disease o Malattia da Circovirus). (7)

All'interno della PCVD si riconoscono forme più gravi, quali la PMWS, e forme moderate o lievi, dove si apprezza comunque un aumento della mortalità e scarti, anche se con percentuali inferiori rispetto a quanto si osserva in corso di PMWS, peggioramento delle performance di crescita e maggiore suscettibilità alla comparsa di complessi nosologici di indubbia gravità.
L'espressione clinica e i conseguenti danni causati dalla PCVD sono legati agli effetti del virus sul sistema immunitario, anche se la descrizione completa dei meccanismi che si attivano successivamente all'infezione sono ancora oggetto di studio.
Una maggiore suscettibilità nei confronti di infezioni secondarie a una ridotta risposta immunologia nei confronti di PRRSV sono stati osservati in corso di infezione da PCV2 (14,15). L'insieme di molti riscontri a carico del sistema immunitario indicano che l'immunosoppressione è una condizione rintracciabile nei suini infetti da PCV2 (8).
Fino a poco tempo fa non era disponibile una terapia e profilassi efficiente per la PCVD e il controllo si basava esclusivamente sulla applicazione delle buone pratiche di allevamento, volti a ridurre genericamente lo stress e l'implementazione di complesse strategie di controllo delle co-infezioni, non senza ripercussioni sull'impiego degli antibiotici e su un loro impiego razionale o "prudente".
Nel contempo, sono stati studiati differenti approcci vaccinali: vaccino spento a virus intero, vaccino spento a sub-unità contenente ORF2 di PCV2, a DNA, a vettore virale con espressione di ORF1 e 2, chimerico vivo attenuato e spento in grado di esprimere PCV2 e PCV1 (10,11,12,13).
I candidati che hanno manifestato la maggiore efficacia in termini di protezione sono stati quelli in grado di esprimere una specifica risposta alla proteina capsidica ORF2. Questa proteina capsidica è stata riconosciuta come quella di maggiore importanza in termini di immunogenicità e di protezione. (9)
Questo studio è stato volto ad indagare le variazioni della mortalità e degli scarti e delle performance produttive correlate alla vaccinazione dei suinetti con Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) in allevamenti italiani che presentavano differenti forme di PCVD.

MATERIALI E METODI

Allevamenti

Lo studio è stato condotto in 4 allevamenti della pianura padana, caratterizzati da differenti tipologie gestionali, multisede o sito unico, e consistenza numerica. Tutte le aziende producevano suino pesante per i circuiti di Parma e San Daniele e accusavano differenti forme cliniche di malattia associata all'infezione da Circovirus (PCVD) il cui ruolo è stato costantemente dimostrato.
Azienda A: allevamento di 400 scrofe, strutturato in multisede (3 siti) con svezzamento a 28 gg circa, trasferimento nel sito 2 per circa 45 gg e successivo alloggiamento nel sito 3 sino alla macellazione.
Azienda B: Allevamento di 700 scrofe a sito unico. I suini venivano svezzati a circa 4 settimane di età, permanevano nelle sale svezzamento per 45 gg circa per venire poi trasferiti nella sezione di magronaggio, dove rimanevano per 60 giorni circa. Successivamente venivano trasferiti nei capannoni di ingrasso.

Azienda C: Allevamento di 1500 scrofe, multisede (3 siti) prevedeva lo spostamento nel sito due a circa 3 settimane di età e successivamente nel sito tre a 15 settimane.
Azienda D: Allevamento di 2000 scrofe multisede (3 siti) spostava i suini dal sito 1 al 2 a 10 settimane di età, dove rimanevano per due mesi circa fino al trasferimento nel sito 3 di ingrasso.
L'anamnesi patologica remota e prossima dei siti sperimentali viene di seguito riportata. Negli allevamenti **A** e **B** era presente una forma acuta di PCVD, con percentuale di scarti e mortalità superiori al 15% associate a deperimento, polmoniti, pallore della cute, ingrossamento dei linfonodi inguinali, frequente comparsa di patologie di irruzione secondaria caratterizzate da scarsa risposta ai trattamenti terapeutici con scarsa performance di crescita. La presenza di PCV2 era stata dimostrata attraverso identificazione del genoma del virus nel sangue e tessuti dei suini clinici in svezzamento o siti due. L'analisi è stata corredata anche da una valutazione quantitativa della presenza di PCV2 nei campioni, tramite QPCR.
Nella prima azienda (**A**) la malattia compariva nella seconda fase di permanenza nel sito due (periodo post-svezzamento), per estendersi anche nei primi due mesi dopo il trasferimento nel sito tre. Precedenti esperienze di profilassi vaccinale, con vaccino spento a virus intero somministrato ai suinetti prima dello svezzamento, non avevano assicurato un abbassamento significativo della percentuale di mortalità e scarti.
Nell'allevamento **B** i problemi comparivano già due settimane dopo lo svezzamento e si mantenevano nel magronaggio.
Negli allevamenti **C** e **D** si osservava una forma più moderata di PCVD, con percentuali di mortalità e scarti comprese tra il 3 il 6%, cui si associava disomogeneità dei suini e performance di crescita non soddisfacenti. Parallelamente, si evidenziava una scarsa risposta ai trattamenti terapeutici e frequente ricaduta dei suini trattati.
La presenza di PCV2 era stata dimostrata attraverso identificazione del genoma del virus nel sangue e tessuti dei suini clinici in svezzamento o sito due. L'analisi è stata corredata anche da una valutazione quantitativa della presenza di PCV2 nei campioni, tramite
Q-PCR per i campioni delle aziende **C**.
La profilassi nei confronti di *Mycoplasma hyopneumoniae* era applicata nelle aziende **A,C,D**, con vaccinazione dei suinetti in lattazione. Tutti gli allevamenti vaccinavano nei confronti del morbo di Aujeszky, con primo intervento a 60 gg e richiamo 30 gg dopo; la azienda **A** vaccinava anche nei confronti di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), nel periodo di permanenza nel sito 2.
Un piano di medicazione strategica era presente in tutti i siti 2: i principi attivi utilizzati erano alternativamente Amoxicillina, Colistina, Clortetraciclina, Sulfamidico + Trimetoprim, e in associazioni differenti a seconda della realtà, età degli animali e situazioni cliniche contingenti.
Nei trasferimenti successivi, i suini ricevevano una medicazione nell'alimento della durata di 3-5 gg dopo l'arrivo.

Disegno sperimentale
Nelle aziende **A,B,C**, i suini inclusi nella prova sono stati allocati casualmente al gruppo vaccinato in ragione del 50% (CircoFLEX) o di controllo (50%). Entrambi i gruppi hanno condiviso le medesime strutture dove erano raggruppati in differenti box (vaccinati e controlli). Il trasferimento tra le sezioni è avvenuto nel medesimo periodo, pertanto entrambi i gruppi hanno avuto in comune ambiente, alimentazio-

ne e condizioni microclimatiche.
Sono stati allocati allo studio 381 suini nel gruppo CircoFLEX e 397 nei controlli (azienda **A**), 522 (CircoFLEX) e 523 (controlli) nella **B** , 927 (CircoFLEX) e 917 (controlli) nella **C**.
Ogni gruppo è stato univocamente identificato.
Sono stati registrati, per ogni gruppo e per ogni sezione di alloggiamento, il numero di suini entrati ed usciti,età, morti, scarti, peso all'ingresso e all'uscita.
I dati sono stati registratati come valore cumulativo per sezione e sono aggiornati alla prima fase di permanenza nel sito tre (ingrasso).
In tutte le aziende, al fine di verificare la relazione tra evidenza clinica e condizione di viremia (Q-PCR) da PCV2, sono stati pianificati prelievi di sangue su 10 suini allocati ai gruppi di controllo il giorno della vaccinazione (T0) 4 settimane dopo (T1).
Un successivo prelievo è stato previsto nel momento della comparsa della PCVD.
Nella azienda **D** è stato condotto uno studio SPC (Statistical Process Control), dove sono stati messi a confronto i dati di 6 lotti di controllo precedenti alla vaccinazione con 6 lotti vaccinati. In totale sono stati inclusi 7199 suini di controllo vs 7367 vaccinati (CircoFLEX). Sono stati raccolti, per ogni gruppo e per ogni sezione di alloggiamento, numero di suini entrarti ed usciti ,età , morti, scarti, peso all'ingresso e all'uscita.

Vaccino
Per l'immunizzazione attiva dei suinetti è stato utilizzato un vaccino inattivato a subunità (Ingelvac CircoFLEX®, Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica). Il vaccino contiene la proteina capsidica ORF2 di PCV2 come componente antigenica e un polimero acquoso, ImpranFlex®, come adiuvante.
I suini allocati nel gruppo CircoFLEX sono stati vaccinati con 1 ml di Ingelvac CircoFLEX®, in dose unica, somministrato per via intramuscolare, una settimana prima dello svezzamento (aziende **C** e **D**) o il giorno dello svezzamento (aziende **A** e **B**).

RISULTATI

I suini vaccinati non hanno presentato alcuna reazione avversa, indipendentemente dalla età di vaccinazione.
I gruppi sperimentali sono risultati omogenei al momento della inclusione.
Nella azienda **A** i suini pesavano mediamente 8,2 Kg in entrambi i gruppi a 28 gg di vita, nell'azienda **B** rispettivamente 6,4 Kg (circoFLEX) e 6,7 Kg (controlli) a 27 gg, nell'azienda **C** 5,9 kg e 5,8 kg a 21 gg. Nell'azienda D al momento dell'allocazione in prova i suini pesavano 19,6 kg (CircoFLEX) a 65 gg di vita e 18,1 kg (controlli) 58 gg di vita.
Clinicamente la PCVD è stata osservata nella sezione di svezzamento in tutte e tre gli allevamenti ad età differenti: in B è comparsa già 4 settimane dopo lo svezzamento, in **A** circa 45 gg dallo svezzamento e in **C** a fine svezzamento. In quest'ultima azienda (**C**) la PCVD è stata preceduta dall'infezione da PRRSv, diagnostica mediante PCR, complicata da S. suis, isolato da soggetti deceduti.
I prelievi di sangue sono stati effettuati a età differenti, in relazione alla sospetta comparsa della PCVD (vedi tabella 1)

Tabella 1: piano prelievi di sangue
Table 1; blood samples collection time

	età (gg di vita)		
prelievo	A	B	C
T0	28	27	21
T1	56	55	49
T2	70	-	63
T3	-	-	92

L'analisi degli esiti sulle PCR effettuate sul sangue ha evidenziato che nessun suino era viremico all'età della vaccinazione.
Nell'allevamento **B** la comparsa della PCVD è stata registrata precocemente, con viremia 4 settimane dopo lo svezzamento.
La concomitanza tra evidenza clinica e viremia da PCV2 è stata rilevata nel T2 nella azienda **A**; in questo gruppo i suini di controllo sono apparsi già viremici nel prelievo precedente, cioè T1, nonostante non presentassero ancora alcun segno clinico: la PCVD si è espressa in tutta la sua magnitudine circa 7 giorni dopo.
Nell'allevamento **C** la correlazione tra elevata viremia e forma clinica si è osservata a 71 gg di vita. Il prelievo T2, effettuato in corso di virosi acuta ha, invece, evidenziato una generale viremia da PRRSv. La totalità dei campioni ematici analizzati è risultata viremica per PCV2 in coincidenza con il trasferimento dal sito due al tre.

Tabella 2: relazione tra prelievo ematico e percentuale di suini risultati viremici per PCV2
Table2: blood collection time and percentage of viremic pigs

	T0		T1		T2		T3	
	%	PCVD	%	PCVD	%	PCVD	%	PCVD
B	0	NO	**60**	**SI**				
A	0	NO	100	NO	**100**	**SI**		
C	0	NO	0	NO	20	NO	**100**	**SI**

In corso di prova sono emerse evidenze di co-infezioni , sostenute da agenti sia batterici che virali. Di particolare gravità è stato l'impatto dell'infezione da APP nella azienda **A**, evidenziato dopo il trasferimento nel sito 3, e quello di PRRSv+S.suis nella azienda **C** dove questa co-infezione si è associata a mortalità in entrambi i gruppi sperimentali che ha preceduto la viremia da PCV2.
La PCVD si è evidenziata tra 9 e 10 settimane di vita nella azienda **A**, tra 7 e 8 settimane di vita nella **B** e a 13-14 settimane nella **C**.
I suini in prova risultano ancora in fase di ingrasso al momento della redazione del presente manoscritto, pertanto i dati di mortalità, scarti sono aggiornati ad una età di circa 150 gg mentre quelli relativi agli incrementi si riferiscono al periodo compreso tra lo svezzamento e il trasferimento all'ingrasso.

La mortalità in tutte le realtà sperimentali è risultata decisamente più bassa nei gruppi CircoFLEX rispetto ai controlli. (Tabella 3)
Nel sito sperimentale A i controlli hanno fatto registrare una mortalità del 34,9% mentre nei vaccinati questa si è attestata all'8,6%. Lo stesso parametro è stato del 6,1% (controlli) vs 2,9% (CircoFLEX) in B, 13,2% (controlli) vs 11,8% (CircoFLEX) in **C** e 1,8% (controlli) vs 1,4% (CircoFLEX) in **D**.
Nella azienda **A** la riduzione tra vaccinati e controlli è stata del 75,4%, in B del 52,5%, in **C** del 10,6% e in **D** del 22,2%.
Anche la percentuale di scarti è stata decisamente inferiore nei gruppi CircoFLEX rispetto i controlli. Segnatamente, in **A** la percentuale di scarti è stata del 9% (controlli) vs 2,4% (CircoFLEX), in **B** del 12,6% (controlli) vs 6,4% (CircoFLEX), in **C** dell'11,3% (controlli) vs 3,8% (CircoFLEX) e in **D** del 2,3% (controlli) vs 1,2% (CircoFLEX).
Percentualmente la riduzione degli scarti nei gruppi vaccinati rispetto ai controlli è stata del 73,3% in **A**, del 49,2% in B, del 66,4% in **C** e del 48% in **D**.
Analogamente ai miglioramenti osservati a carico dei parametri sanitari, è stato apprezzato in tutti i gruppi CircoFLEX un migliore incremento ponderale giorno (IPG): il dato è stato calcolato nel periodo dallo svezzamento all'ingresso in fase di ingrasso per le aziende **A,B,C** e per il periodo di magronaggio nell'allevamento **D**.
Il miglioramento dell'IPG è stato pari a: + 38g/die nell'allevamento **A**, +17g/die in B, +34g/die in **C** e +29g/die in **D**.

DISCUSSIONE

I gruppi CircoFLEX hanno presentato un notevole miglioramento dei parametri sanitari e delle performance di crescita rispetto ai controlli, in tutti gli allevamenti inclusi nello studio.
Nelle aziende **A, B** e **C** i suini vaccinati, pur condividendo le medesime condizioni ambientali, hanno espresso una chiara differenza nella risposta alla infezione da PCV2 e alle successive co-infezioni. Nelle aziende classificate con PCVD acuta la riduzione della mortalità e degli scarti, successivamente alla viremia da PCV2, è risultata superiore al 50% con valori del 75% nella azienda A. In quest'ultima azienda la differente condizione degli animali assicurata dalla vaccinazione è stata, inoltre, ribadita anche dopo il trasferimento all'ingrasso, dove gli animali hanno subito una grave infezione da Actinobacillus pleuropneumoniae. La pleuropolmonite ha colpito entrambi i gruppi con incidenza di mortalità e scarti, però, decisamente inferiore nel gruppo CircoFLEX rispetto ai suini conviventi di controllo. Inoltre, in entrambe le aziende si è apprezzato un sensibile miglioramento nelle performance di crescita, con un aumento degli incrementi giornalieri, dallo svezzamento all'inizio della fase di ingrasso.
Il vaccino ha confermato la sua efficacia anche negli allevament**i C** e **D** che presentavano una forma moderata o lieve di PCVD.
In **C** si è osservata l'insorgenza di un'infezione da PRRSv, complicata da S. suis , prima ancora che si determinasse la viremia da PCV2. Questa co-infezone ha impresso un deciso aumento della mortalità, mentre i suini erano nella prima fase di permanenza nel sito 2. I suini vaccinati hanno, però, espresso nell'intero periodo esaminato (svezzamento-1 mese dopo trasferimento all'ingrasso) una minore percentuale di mor-

Tabella 3: Dati generali suini in prova
Table 3: Overall data from the trial groups

		PCVD acuta				PCVD moderata-lieve			
		B	B	A	A	C	C	D	D
PERIODO		CircoFLEX	controllo	CircoFLEX	controllo	CircoFLEX	controllo	CircoFLEX	controllo
Svezzamento	Età media ingresso	25	27	28	28	21	21		
	numero	**522**	**523**	**381**	**397**	**927**	**917**		
	peso medio entrata	6,4	6,7	8,2	8,2	5,9	5,8		
	% mortalità	**1,1**	**3**	**2,1**	**8,8**	**10,5**	**8,7**		
	% scarti	**3,8**	**10,9**	**0,5**	**0,8**	**3,1**	**9,5**		
	peso medio uscita	33,5	33,7	28,9	26,8	29,4	26,8		
	Età media uscita	87	88	82	82	92	92		
	co-infezioni	*PRRSv,*				*PRRSv,*			
Magronaggio	Età media ingresso	87	88					65	58
	Numero	496	450					**7367**	**7199**
	Peso medio entrata	33,5	33,7					19,6	18,1
	% mortalità	**1,6**	**1,8**					**1,4**	**1,8**
	% scarti	**1,8**	**1,1**					**1,2**	**2,3**
	peso medio uscita	62,8	56,9					66,2	55,5
	co-infezioni	*APP, H.parasuis*						*APP, S.suis*	
	IPG medio 1	**493**	**477**	**386**	**348**	**331**	**295**	**588**	**559**
Ingrasso	Età media ingresso	140	133	82	82	92	92	144	125
	numero	479	437	371	361	800	743	7175	6927
	% mortalità	**0,2**	**1,3**	**6,5**	**26,1**	**1,3**	**4,5**		
	% scarti	**0,8**	**0,6**	**1,9**	**8,2**	**0,7**	**1,8**		
	co-infezioni	*APP, H. parasuis*		*APP*					
DATI cumulativi	**% mortalità tot**	**2,9**	**6,1**	**8,6**	**34,9**	**11,8**	**13,2**	**1,4**	**1,8**
	Riduzione mortalità	**(-52,5%)**		**(-75,4%)**		**(-10,6%)**		**(-22,2%)**	
	% scarti tot	**6,4**	**12,6**	**2,4**	**9**	**3,8**	**11,3**	**1,2**	**2,3**
	Riduzione scarti	**(-49,2%)**		**(-73,3%)**		**(-66,4%)**		**(-48%)**	
	Miglioramento IPG	**+ 17 g**		**+ 38 g**		**+ 34 g**		**+ 29 g**	

1: IPG calcolato dallo svezzamento al trasferimento all'ingrasso per **A,B,C** e dall'entrata all'uscita del magronaggio per **D**

ti, scarti e un migliore incremento ponderale giornaliero, confermando un contributo della vaccinazione anche in condizioni in cui è prevalente il ruolo patogenetico di altre infezioni. Lo studio SPC effettuato nella Azienda **D** (oltre 7000 suini inclusi per ogni gruppo di trattamento) ha evidenziato il miglioramento, sia sanitario sia di performance di crescita, nei vaccinati rispetto ai controlli. Anche alla presenza di una forma clinica lieve, comprovata da una percentuale di scarti e morti bassa nei gruppi di controllo, la vaccinazione ha assicurato un miglioramento sanitario, accompagnato da un superiore incremento ponderale giorno.

I risultati ottenuti negli animali inclusi nello studio, aggiornati al primo mese circa di permanenza in ingrasso, dimostrano un significativo miglioramento di tutti i parametri esaminati.

Anche alla presenza di importanti co-infezioni, capaci di produrre un effetto sulle percentuali di mortalità e scarti, soprattutto quando intervengono prima dell'avvento della viremia da PCV2, la vaccinazione dei suinetti è stata efficace e capace di assicurare una migliore performance generale.

La vaccinazione con Ingelvac CircoFLEX è risultata efficace nella riduzione della mortalità, scarti e nel migliorare la crescita in tutti gli allevamenti inseriti nello studio. I gruppi vaccinati hanno espresso una pronunciata riduzione del prodotto non conforme (morti e scarti) e sono cresciuti maggiormente in presenza di forme differenti di PCVD.

Bibliografia:

1- Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Botner A, McCullough K, et al. PMWS:
experimental model and co-infections. Vet Microbiol 2004;98(2):165–8.

2- Rovira A, BalaschM, Segales J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J Virol 2002;76(7):3232–9.

3- Sorden SD. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Swine Health Prod. 2000;8(3):133-136.

4- Martelli P., Terreni M., Borghetti P., Amena N., Morvan H., Cavirani S. "Aspetti clinici e diagnostici in corso di un focolaio di sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS)" (2000) Atti XXVI Meeting SIPAS, Piacenza.

5- Marcato P.S., Sidoli L., Mandrioli L., Della Salda L., Cerati C. , Rolla G.L. La sindrome multisistemica del deperimento postsvezzamento (PMWS = postweaning multisystemic wasting syndrome). Indagini clinico-patologiche in un focolaio di PMWS in Nord Italia. Atti del XXV Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, 1999, 107-124.

6- Sanchez, R., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2001. Serological survey of porcine circovirus type 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: Proceedings of an International Conference on ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, St. Malo, France

7- Segales J. (2007): Global, local, and individual perspectives on PCVD. 20-25, Kernkamp Lecture at Leman Conference

8- Segales J. Immunosuppression as a feature of postweaning multisystemic wasting sindrome. The Veterinary Journal 171 (2006) 396–397

9- Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA,Cordioli P, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemicwasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. Vaccine 2003;21(November (31)):4565—75.

10- Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: diagnosis, disease and control: what do we know? Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. 2006.

11- Ju C, Fan H, Tan Y, Liu Z, Xi X, Cao S, et al. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. Vet Microbiol2005;109(August (3—4)):179—90.

12- Wang X, Jiang W, Jiang P, Li Y, Feng Z, Xu J. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. Vaccine 2006;24(April (16)):3374—80.

13- Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. J Virol 2004;78(June (12)):6297—303.

14- Rovira A, Balasch M, Segales J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. J Virol 2002;76(April (7)):3232—9.
15- Opriessnig T, McKeown NE, Harmon KL, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus
type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. Clin Vaccine Immunol 2006;13(8):923–9.
16- Clark T. Pathology of the postweaning multisystemicwasting syndrome of pigs. In: First proceedings of the Western Canadian association of swine practitioners. 1996. p. 22–5.
17- Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromesand diseases. Vet J 2005;169(May (3)):326—36.
18- Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. Vet Microbiol 2004;98(February (2)):159—63.
19- Harding JC. The clinical expression and emergence of porcinecircovirus 2. Vet Microbiol 2004;98(February (2)):131—5

DIAGNOSI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO DI SWINEPOXVIRUS, AGENTE DI MALATTIA CUTANEA SPORADICA, DURANTE IL PERIODO 2002-2008 NEL NORD ITALIA

ELECTRONMICROSCOPIC DIAGNOSIS OF SWINEPOXVIRUS, AETIOLOGICAL AGENT OF SPORADIC SKIN DISEASE DURING THE PERIOD 2002-2008 IN NORTHERN ITALY

CRISTIANA TITTARELLI, ENRICA SOZZI, BRUNELLA SPAGGIARI, G. LORIS ALBORALI, PAOLO CORDIOLI, ANTONIO LAVAZZA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B.Ubertini", via Bianchi 7/9, 25124, Brescia, Italy

Parole chiave: swinepoxvirus, microscopia elettronica, diagnosi differenziale

Key words: swinepoxvirus, electron microscopy, differential diagnosis

Riassunto. Durante il periodo 2002-2008, un totale di 44 campioni di cute appartenenti a suinetti o feti provenienti dalla sezione diagnostica di Brescia o dalle Sezioni Diagnostiche provinciali dell'IZSLER di Lombardia ed Emilia Romagna, sono stati esaminati presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica. Dei 44 casi esaminati soltanto in 5, pari a 11,3%, è stata emessa diagnosi di vaiolo, confermando la sporadicità della patologia. Di questi, 3 casi erano rappresentati da suinetti lattanti o in svezzamento e 2 erano costituiti da feti.
La microscopia elettronica si è dimostrata uno strumento rapido ed efficace.

Abstract. During the period 2002-2008, 44 skin samples were performed in northern Italy by electron microscopy (EM). In 5 (11.3%) cases a diagnosis of suipoxvirus was ascertained, corfirming that the disease is sporadic. Of these, 3 cases were piglets or weaning pigs, 2 were foetuses. Negative staining EM is a useful tool for diagnosis of poxvirus infection in pigs.

INTRODUZIONE

SWP virus (SWPV) è l'unico membro del genere *Suipoxvirus* all'interno della famiglia Poxviridae (Moyer, 2000). Esso è responsabile del vaiolo suino, una patologia cosmopolita a decorso acuto, lieve o subclinico, associata di solito a condizioni igienico-sanitarie scadenti. Pur infettando suini di tutte le età, i soggetti giovani (fino a 3 mesi di età) risultano più sensibili, mentre gli adulti generalmente sviluppano una forma lieve, auto-limitante della malattia. I pidocchi (*Haematopinus suis*) sono considerati agenti primari della trasmissione, ma occasionalmente è stata segnalata anche la trasmissione orizzontale in seguito al contatto delle secrezioni orali e nasali con soluzioni di continuo della cute (Delhon *et al.* 2006). L'infezione congenita, conseguente al passaggio del virus per via transplacentare, è stata riportata per la prima volta da Borst *et al.* (1990). Più recentemente Mazzoni et al. (2002) e Moorkamp *et al.* (2008) hanno descritto un episodio di vaiolo suino congenito, rispettivamente in Italia e

Germania. In tutti e tre i casi la trasmissione verticale del virus esitava nella nascita di uno-due suinetti per covata con efflorescenze distribuite sull'intera superficie cutanea.
Il genoma del SWPV è costituito da una molecola di DNA a doppia elica costituita da 146 paia di kilobasi che sembrano contenere 150 geni. Nonostante sia geneticamente correlato ad altri membri di Poxvirus (capripoxvirus, leporipoxvirus, yatapoxvirus), SWPV rappresenta un genere distinto (Afonso *et al.*, 2002), in grado di infettare solo il suino. SWPV richiede diversi passaggi in colture cellulari di origine suina prima di indurre effetto citopatico (CPE), mentre i tentativi di isolare il virus in colture di origine diversa dal suino o sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate sono falliti, confermando la specificità d'ospite (Delhon *et al*. 2006).
La diagnosi di sospetto può essere formulata sulla base dell'osservazione delle tipiche lesioni cutanee diffuse su tutta la superficie del corpo, con una lieve predominanza per i padiglioni auricolari, l'addome e la faccia interna delle cosce. Nonostante le perdite economiche conseguenti alla patologia siano poco rilevanti, un buon sistema diagnostico di conferma, comprendente la microscopia elettronica, l'esame istologico o le tecniche di biologia molecolare, sono essenziali per escludere altre diagnosi differenziali, tra cui vanno incluse malattie vescicolari, lesioni cutanee di origine allergica, eritemi solari, dermatiti batteriche, tricofitosi e parassitosi cutanee (*Tyroglyphus* spp, rogna sarcoptica) (Blood and Radostis, 1989; Yager and Scott, 1985).
Scopo di questo lavoro è quello di raccogliere i casi di sospetto vaiolo nel periodo dal 2002 al 2008 nel Nord Italia e di confermare il sospetto clinico con l'ausilio della microscopia elettronica.

MATERIALI E METODI

Campioni
Durante il periodo 2002-2008, un totale di 44 campioni di cute appartenenti a suinetti o feti che presentavano lesioni potenzialmente riferibili a vaiolo (Figura 1), provenienti dalla sezione diagnostica di Brescia o dalle Sezioni Diagnostiche provinciali dell'IZSLER di Lombardia ed Emilia Romagna, sono stati esaminati presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica (Tabella 1). I campioni, prelevati in singolo o suddivisi in *pool* in sede di esame anatomopatologico, sono stati immediatamente congelati a –20°C e successivamente sottoposti ad indagine ultramicroscopica come descritto di seguito.

Esame elettron-microscopico
L'esame al ME in colorazione negativa è stato eseguito con il metodo "della goccia" (Gibbs et al., 1980). Porzioni di cute, sede di lesioni, sono state stemperate in soluzione salina tamponata (PBS) e omogenate in un mortaio. Griglie in rame rivestite in Formvar sono state poste a flottare per 10 minuti su una goccia di estratto in esame, colorate negativamente con una soluzione al 2% del sale sodico dell'acido fosfotungstico (NaPt), PH 6,8, ed esaminate con un TEM Philips CM10, operante a 80 KV, ad ingrandimenti compresi tra 15500 e 28500X.

Isolamento virale
Gli omogenati di porzioni di cute sede di lesioni del caso positivo n° 5 sono stati inoculati su colture primarie di rene suino e su linea cellulare continua PK-15. Le colture cellulari inoculate sono state incubate in termostato a 37°C con atmosfera contenente il 5% di CO2 e osservate quotidianamente per verificare lo sviluppo di effetto citopatico. Dopo 6 giorni

d'incubazione, in assenza di manifestazione di effetto citopatico, sono state sottoposte a congelamento e scongelamento e il criolisato nuovamente inoculato su colture cellulari di recente allestimento. I campioni sono considerati negativi dopo 3 passaggi seriali senza comparsa di effetto citopatico.

RISULTATI

Come indicato in tabella 1, dei 44 casi esaminati soltanto in 5, pari a 11,3%, è stata emessa diagnosi di vaiolo, confermando la sporadicità della patologia. Di questi, tre casi erano rappresentati da suinetti lattanti o in svezzamento e due erano costituiti da feti (Tabella 2). In tutti e cinque i casi riportati era stato formulato un sospetto di vaiolo sulla base dell'esame anatomo-patologico (Tabella 3). Gli allevamenti di provenienza erano tutti a ciclo aperto, tranne uno, con consistenze variabili da 300 a 700 scrofe.
L'esame al microscopio elettronico in colorazione negativa ha permesso di osservare, in tutti i campioni esaminati, numerose particelle virali riferibili per morfologia a poxvirus (Figura 2). In tutti i casi è stato eseguito l'esame batteriologico (Tabella 3) e in un caso è stata segnalata un'infezione batterica da *Staphylococcus aureus*. Nei due casi riportati di natimortalità, sono stati fatti inoltre accertamenti diagnostici per escludere la presenza dei più comuni virus abortigeni (parvovirus, malattia di Aujeszky, PRRS) con esito sempre negativo.

Tabella 1. Risultati degli esami al ME su campioni di cute durante il periodo 2002-2008
Table 1. Results of EM on skin samples during the period 2002-2008

Anno		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Totale
Totale esami		11	3	6	10	4	4	6	44
Negativi	N°	10	3	4	9	4	4	5	39
	%	90.9	0.0	66.7	90.0	0.0	0.0	83.3	88.7
Positivi	N°	1	0	2	1	0	0	1	5
	%	9.1	0.0	33.3	10.0	0.0	0.0	16.7	11.3

Tabella 2. Campioni conferiti suddivisi per anno, numero di campioni, età, tipologia di allevamento e provenienza
Table 2. Samples divided for year,number of samples, age, type of farming and geographical origin

Caso	Anno	N°campioni	Età	Tipologia di allevamento	N°scrofe	Provenienza
1	2002	4	Feto	Ciclo aperto	400	Brescia
2	2004	9	Feto	Ciclo aperto	700	Brescia
3	2004	6	Suinetti	Ciclo aperto	400	Rovigo
4	2005	1	Svezzamento	Ciclo chiuso	400	Brescia
5	2008	1	Lattante	Ciclo aperto	300	Modena

Figura 1. Lesioni riferibili a Poxvirus sulla cute di un suinetto con infezione naturale (caso clinico N° 4)
Figure 1. Swine pox lesions on the skin of natural infected pig (clinical case N°4).

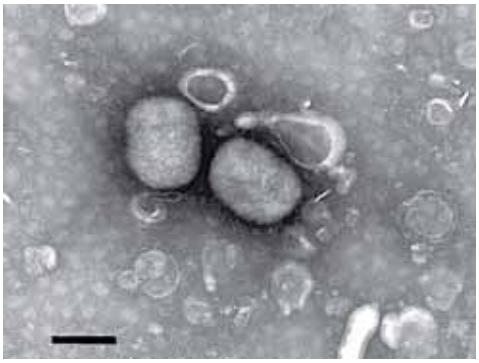


Figura 2. Immagine al ME in colorazione negativa di particelle virali riferibili a Poxvirus (bar: 200 nm).
Figure 2. Negative staining of swine pox virus particles (bar: 200 nm)

Tabella 3. Risultati dell'esame anatomo-patologico, batteriologico e virologico eseguiti sui campioni positivi per poxvirus
Table 3. Results of necropsy, batteriologic and virologic exams performed on positive samples

Caso clinico	Es. anatomo-patologico	Es. Batteriologico	Es. virologico	Ab Parvovirus	Malattia di Aujeszky		PRRS		PCV2		
					Ab gB	IF	Ab	Pcr	Pcr	IF	Elisa
1	Lesioni cutanee vescicolari e collaretti epidermici che lasciano profonde erosioni	neg	n.e.	neg	neg	n.e*	neg	neg	pos	pos	neg
2	Lesioni papulo-vescicolari cutanee diffuse su tutto il corpo	neg	n.e.	neg	neg	n.e	neg	neg	n.e	n.e	n.e
3	Papule crostose in vari distretti cutanei spt. regione addominale	neg	n.e.	n.e.	n.e	n.e	n.e	Peuropeo	n.e	n.e	n.e
4	Lesioni crostose tondeggianti focali diffuse a tutto il corpo	Staph.aureus	n.e.	n.e.	1/256	neg	n.e	Peuropeo	neg	neg	n.e
5	Esantema papuloso diffuso a tutta la superficie cutanea e alla mucosa orale	neg	pos.	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e

*n.e: non eseguito, not performed

L'esame virologico su colture cellulari inoculate con omogenato di cute positivo per poxvirus del caso n°5 ha consentito l'isolamento virale. In particolare la presenza di effetto citopatico è stata rilevata sia su cellule primarie di rene suino sia su linea continua di PK-15 (Figg. 3 e 4). L'identificazione virale è stata confermata tramite esame al microscopio elettronico in colorazione negativa.

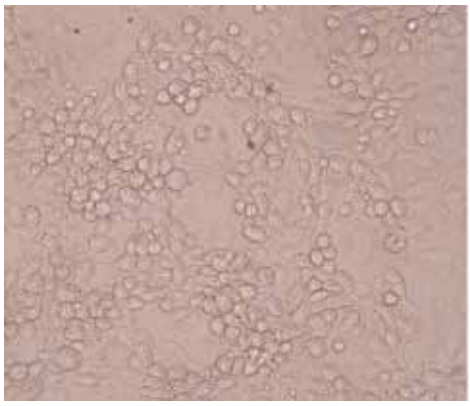


Figura 3. SWPV: effetto citopatico su PK15 a 5 gg p.i.
Figure 3. Swine pox virus: CPE on PK15 cells at 5 days p.i.

Figura 4. SWPV: effetto citopatico su RS a 3 gg p.i.
Figure 4. Swine pox virus: CPE on primary porcine kidney cells at 3 days p.i.

DISCUSSIONE

Questo lavoro confermerebbe la sporadicità della patologia che, pur comportando ridotte perdite economiche va comunque sempre tenuta in debita considerazione, oltre che la sua tendenza a colpire animali in giovane età.
La diagnosi su base clinica della forma cutanea risulta piuttosto agevole, sulla base delle tipiche lesioni cutanee (Figura 1). Tuttavia la natura e la distribuzione delle lesioni possono essere influenzate da infezioni batteriche secondarie, complicando in questo caso la diagnosi. In particolare il vaiolo, nella sua forma cutanea, va posto in diagnosi differenziale con forme di epidermite essudativa da *Staphylococcus hyicus*, malattie vescicolari (afta, malattia vescicolare), mal rosso, mentre nella forma congenita, che esita in natimortalità e mortalità neonatale, va differenziato da patologie abortigene, quali infezioni da parvovirus, malattia di Aujeszky, *porcine reproductive* and *respiratory syndrome* (PRRS).
Visto il ridotto impatto economico della patologia, non è stato prodotto alcun vaccino, e il controllo della malattia si basa principalmente sul controllo nell'ingresso di animali portatori e sul mantenimento di buone condizioni igienico-sanitarie, compreso il controllo degli ectoparassiti.
La scarsa numerosità campionaria ma anche la sporadicità dei casi osservati non consente di fare considerazioni su come la tipologia di allevamento possa influenzare la comparsa della patologia e neanche di valutare l'eventuale relazione epidemiologica tra gli allevamenti in esame.

CONCLUSIONI

I dati raccolti in questo studio sono indicativi di una bassa incidenza della patologia, probabilmente a seguito di un miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie in allevamenti con un buon livello organizzativo e manageriale. Si ritiene tuttavia che la patologia potrebbe anche essere sottostimata in quanto, visto il ridotto impatto economico, i campioni spesso non verrebbero conferiti al laboratorio per un approfondimento diagnostico. Per quanto riguarda la valutazione del metodo di indagine utilizzato, la microscopia elettronica si è dimostrata uno strumento rapido ed efficace, considerato anche l'elevato titolo virale presente nelle lesioni cutanee. Inoltre, la recente disponibilità della sequenza genomica del SWPV (Afonso, 2002) permetterebbe lo sviluppo di tecniche molecolari altrettanto rapide, sensibili e specifiche che consentirebbero anche di confrontare la sequenza dei ceppi italiani isolati fino ad ora con quelli americani per valutare eventuali differenze e variabilità genomica del poxvirus suino.

RINGRAZIAMENTI: si ringraziano la Sig.ra Michela Fazio e i Sigg. Giuseppe Bertocchi e Giovanni Bozzoni per il supporto tecnico e fotografico.

Bibliografia

1. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, Kutish GF, Rock DL (2002). The genome of swinepox virus J Virol 76:783-790.
2. Blood DC, Radostits OM (1989). Veterinary Medicine: A textbook of the disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses (7th edition). Bailliere Tindall, London. Pp 571-958.
3. Borst GH, Kimman TG, Gielkens AL, van der Kamp JS (1990). Four sporadic cases of congenital swinepox. Vet Rec 127:61-63.
4. Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, Rock DL (2006). Swine Pox in : Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ "Diseases of swine". 9th ed., Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 483-487.
5. Gibbs EPJ, Smale CJ, Voyle CA (1980). Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. Vet Rec. 106, 451-458.
6. Mazzoni C, Gherpelli M, Dottori M, Merialdi G, Gelmetti D, Lavazza A (2002). Descrizione di un episodio di vaiolo suino congenito. Atti della società italiana di patologia ed allevamento dei suini. XXVIII Meeting annuale, Piacenza, 303-307.
7. Moorkamp L, Beineke A, Kaim U, Diesterbeck U, Urstadt S, Czerny CP, Ruberg H, Grosse Beilage E. (2008). Swinepox-skin disease with sporadic occurrence. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2008 Apr; 115(4): 162-6.
8. Moyer RW, Arif B, Black DN, Boyle DB, Buller RM, Dumbell KR, Esposito JJ, McFadden G, Moss B, Mercer AA, Ropp S, Tripathy DN, Upton C. (2000). Family Poxviridae. In Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruesee. MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, Eb Carstens, MH Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle, RB Wickner, eds. San Diego: Academic Press, pp. 137-157.
9. Yager JA, Scott DW (1985). The skin and appendages. I n KVF Jubb, PC Kennedy, N Palmer, eds. Pathology of Domestic Animals (3rd edition), Volume 1. Orlando: Academic Press, pp 407-549.

RELAZIONI TRA LO SPESSORE DEL LARDO DORSALE ED ALCUNI INDICI RIPRODUTTIVI DI SCROFE

RELATIONSHIP BETWEEN BACKFAT DEPTH AND SOME REPRODUCTIVE INDICES IN SOWS

TONON F*., ROSSETTO G*., MAZZONI C*. , STELLETTA C.**

****Medico Veterinario Libero professionista.***
*****Medico Veterinario,PhD - Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova.***

Parole chiave: scrofa, spessore lardo, parametri riproduttivi

Key words: sow, backfat depth, reproductive parameters

Riassunto. Numerosi studi sono stati svolti per identificare la relazione tra spessore del lardo dorsale delle scrofe e performance riproduttive poiché la possibilità di utilizzo delle tecnologie ultrasoniche permette l'introduzione nella pratica aziendale di uno strumento utile per la valutazione del mantenimento delle condizioni corporee relative al ciclo produttivo. Nel presente lavoro si considerano le differenze in performance riproduttive valutabili in dipendenza dell'ordine di parto e di 4 classi di spessori di lardo misurati a fine gravidanza (ED) e a fine lattazione (EL). Le variazioni evidenziate sono a carico delle primipare con un valore medio di intervallo svezzamento-1° calore utili (IS-1°CU) significativamente differenti tra classi di spessore di grasso (20.26 giorni e 12.88 giorni per le classi <10 mm di EL e >20 mm di EL). Le altre differenze evidenziabili sono tra ordini di parto per l'IS-1°CU, per l'interparto e per il numero totale di suinetti.

***Abstract*.** Ultrasonic technology may be easily used to measure the backfat values (depth, loss) and to study the relationship with reproductive performance of sows during the productive phases of the pig industries. Aim of the work was the evaluation of differences among 4 classes of fat tissue measurements carried out at the end of pregnancy and at the third week of lactation (EL). Primiparous sows overemphasize the effect of their backfat depth (20.26 days and 12.88 days of weaning-1th useful estrous interval for the <10 mm EL and >20 mm EL classes respectively). The other significant differences were among parity order for weaning-1th useful estrous interval, interpartum length and litter size.

INTRODUZIONE

Le relazioni esistenti tra le variazioni della condizione corporea e le capacità riproduttive sono state indicate come importanti nella gestione di impianti suinicoli per la riproduzione. Tali variazioni sono state osservate con diverse metodiche comprendendo l'osservazione visiva diretta e la misura ecografica dello spessore di lardo. L'intensità di variazione di peso corporeo durante alcune fasi del ciclo produttivo, con particolare riguardo

alla lattazione, è stata indicata come possibile fattore influenzante il periodo di intervallo svezzamento-estro (ISE). Numerosi fattori possono influenzare la capacità di utilizzo delle riserve energetiche; la genetica, il numero di parti e gli stimoli ambientali (alimentazione, temperatura, luce) sono alcuni di essi (Aherne FX et al. 1992; Schneider JD et al.2007; Tummaruk et al. 2007; Lucy, 2008). Molte biotecnologie sono attualmente disponibili per poter utilizzare proficuamente le informazioni derivanti dalle variazioni delle capacità metaboliche. Esse comprendono numerose applicazioni di laboratorio (genetici, biochimici, endocrinologici) e di campo (valutazione ultrasonica e/o visiva). L'applicazione pratica di strumentazioni di monitoraggio può dare utili indicazioni riguardanti la gestione di diverse fasi produttive delle scrofe. Scopo del presente lavoro è stato la valutazione l'influenza dello spessore di lardo e la variazione dello stesso durante il ciclo produttivo su alcuni indici riproduttivi di scrofe.

MATERIALI E METODI

I dati sono derivati dalla registrazione degli eventi in un allevamento di 2500 scrofe di un ibrido commerciale (UPB Genetic World), raccolti dal 2004 al 2008. Per le primipare sono state considerati i valori di spessore di lardo al momento della 1° fecondazione ed alla fine dello svezzamento oltre alle variazioni tra i due momenti. Per le pluripare sono stati considerati dal 2° al 7° parto con valori di spessore di grasso al momento dello spostamento in sala parto ed alla fine della lattazione oltre alle variazioni tra i due momenti. I dati di ogni scrofa sono stati selezionati in dipendenza della presenza delle misurazioni durante il ciclo produttivo successivo. I dati riproduttivi e produttivi valutati sono stati l'interparto (IP) e l'intervallo svezzamento-1° calore utile (IS1°CU), il numero di suinetti nati totali (TOT) e di svezzati (SVZ). Lo spessore di lardo è stato valutato attraverso l'utilizzo dello strumento portatile a misurazione ultrasonica (Lean Meter - Renco corp.) a 6 cm dalla linea mediana dorsale a livello della 10ª costola. I valori riscontrati nei diversi momenti di valutazione sono stati stratificati in classi di spessore in gravidanza (1: <10; 2: ≥10-<15; 3: ≥15<20; 4: ≥20), a fine lattazione(1: <10; 2: ≥10-<15; 3: ≥15<20; 4: ≥20), e di variazioni tra i due momenti (1: <0; 2: ≥1-<6; 3: ≥6<11; 4: ≥11). L'analisi statistica, effettuata attraverso ANOVA secondo la procedura GLM del software SigmaStat 2.03, ha preso in considerazione come variabili indipendenti le classi degli spessori valutati, le relative variazioni, il numero di parti mentre come variabili dipendenti i parametri produttivi e riproduttivi suddetti. Inoltre sono state effettuate analisi descrittive delle variazioni degli spessori in dipendenza del mese di misurazione e le variazioni delle performance produttive in dipendenza di classi di IS-1°CU (0-3 giorni; 4-7 giorni; 8-12 giorni; 13-19 giorni; >20 giorni).

RISULTATI

Il numero di rilievi presi in considerazione è stato pari di 10262 (1°parto: 2653; 2°parto: 2259; 3°parto: 1879; 4°parto: 1463; 5°parto: 994; 6°parto: 650; 7°parto:364). I valori dell'IP, di IS-1°CU, TOT e SVZ non differiscono significativamente tra le classi di spessore di lardo riscontrate in gravidanza e di variazione tra i due momenti di misurazione. Alcuni valori dei parametri considerati differiscono significativamente in dipendenza delle

classi di spessore di lardo riscontrate a fine lattazione e dell'ordine di parto (Tabella 1.)
In particolare si evidenzia una significativa differenza tra gli animali più magri (<10 mm) e le altre classi (P<0.05) per i valori di IS-1°CU del primo parto. La presenza costante per i primi 5 parti della differenza tra le classi di spessore di fine lattazione per il valore di spessore di lardo misurato nella gravidanza successiva (Tabella 1.) indica una stabilità di recupero delle diverse classi.
L'analisi della variazione di spessore di lardo misurato a fine gravidanza ed a fine lattazione in dipendenza del mese dell'anno rileva un andamento sovrapponibile per entrambi i valori. Si assiste ad un aumento dello spessore nei mesi luglio-dicembre soprattutto per i primi ordini di parto (2°-4° parto) ed una diminuzione nei mesi gennaio-giugno soprattutto per gli ordini di parto 6°-8° (Figura 1.e 2.)
L'analisi dei valori di spessore di lardo a fine gravidanza, a fine lattazione ed i valori di numero totale di suinetti in dipendenza di classi di IS-1°CU ha evidenziato che le scrofe con 0-3 giorni di IS-1°CU partoriscono un numero totale di suinetti maggiore negli ordini di parto 2°,3° e 4° (grafico 1.); le scrofe che hanno un IS-1°CU di 0-3 giorni sono tendenzialmente più magre a fine gravidanza negli ordini di parto 2°,3° e 4° rispetto alle scrofe con 4-7 giorni e 8-12 giorni di IS-1°CU (grafico 2.); per quando concerne lo spessore a fine lattazione si assiste ad un andamento bifasico in dipendenza dell'ordine di parto, con valori più bassi nelle scrofe con intervalli di 0-3 nel 2°, 3° e 4° ordine di parto, mentre nei successivi parti si assiste ad un valore maggiore di tale parametro rispetto alle scrofe con 4-7 giorni e 8-12 giorni IS-1°CU (grafico 3.).

DISCUSSIONE

L'intervallo svezzamento-estro è ritenuto tra i parametri più importanti per calcolare i giorni non produttivi delle scrofe. Esso dipende da numerosi fattori come la lunghezza della lattazione, l'ordine di parto, numero di suinetti nati, stagione, nutrizione, l'esposizione al verro, la genetica, le malattie e la gestione. Dai risultati ottenuti si evidenzia una sostanziale differenza tra le performance riproduttive delle primipare con una condizione di ingrassamento differente sottolineando l'importanza della gestione di questa classe di animali che aumentano significativamente il loro IS-1°CU nei casi di scarsa condizione corporea (<10 mm di spessore). Tali valori non si discostano negli ordini di parto successivi al primo. Il valore di IS-1°CU è stato calcolato indirettamente dal valore di interparto e definendo la lunghezza della gravidanza pari a 114 giorni. Alcuni autori indicano i valori di 3-5 giorni e 9-21 giorni come i migliori intervalli di svezzamento-estro (Polese E. et al, 2006) per le performance successive. Tranne che per la classe di scrofe con il maggior spessore di lardo (>20mm) si evidenzia una differenza per i valori di IS-1°CU, di IP e di TOT tra il 1° ed i successivi parti. Tale differenza tra ordine di parto è stata riportata in altri lavori ma senza una significativa relazione con la condizione corporea ma influenzata dalle caratteristiche metaboliche specifiche (Guedes et al., 2001). Si devono considerare infatti i numerosi fattori ormonali incidenti sul metabolismo in grado di mutarlo da catabolico a anabolico e viceversa. L'andamento bifasico dello spessore a fine lattazione durante i 5 parti (figura.3) considerati per le scrofe con il minore ISC-1°CU rispetto alle altre classi può essere indicativo dell'effetto dell'asse somatotropico che è maggiormente attivo durante primi cicli produttivi (Lucy MC, 2008).

TABELLA 1. Valori di Intervallo svezzamento 1°calore utile, interparto, spessore di lardo nelle gravidanze successive; numero totale di suinetti nati e numero di suinetti svezzati (media ± SEM) in dipendenza dell'ordine di parto e classe di spessore a fine lattazione

	Classe spessore a fine lattazione	PARTO						
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
ISCU	<10 mm	20.26±0.84a*	10.31±0.71*	8.74±0.66*	8.03±0.73*	7.81±0.83*	7.76 ± 0.94*	8.15±1.26*
	≥10-<15 mm	14.02±0.34b***	10.1±0.36**	7.69±0.40*	7.26±0.45*	7.06±0.54*	7.7±0.70*	6.63±0.91*
	≥15<20 mm	12.56±0.45b**	8.65±0.55*	7.47±0.65*	7.34±0.79*	6.47±1.05*	6.85±1.32*	6.45±1.98*
	≥20 mm	12.88±1.38b	7.21±1.68	7.23±2.80	6.88±2.63	6±5.88	5.5±6.58	3.67±7.60
IP	<10 mm	157.51±0.85**	146.87±0.72*	144.58±0.67*	143.60±.74*	143.55±0.84*	143.02±0.95*	143.55±1.28*
	≥10-<15 mm	151.19±0.34***	146.05±0.37**	143.14±0.40*	142.68±0.46*	142.2±0.55*	142.8±0.71*	141.66±0.92*
	≥15<20 mm	149.33±0.46**	144.24±0.56*	142.65±0.66*	142.46±0.80*	141.52±1.06*	141.92±1.33*	140.98±2*
	≥20 mm	149.82±1.4	142.46±1.7	141.68±2.84	141.82±.66	140.4±5.95	139.25±6.66	137.33±7.69
P2	<10 mm	13.53±0.20a	13.25±0.17a	13±0.15a	12.81±0.17a	13±0.19°	13.8±0.22°	13.05±0.30°
	≥10-<15 mm	15.75±0.08b	15.13±0.08b	15.15±0.09b	15.04±0.10b	15.26±0.13b	15±0.16bc	14.68±0.21b
	≥15<20 mm	17.92±0.10c	17.35±0.13c	17.71±0.15c	17.45±0.18c	16.88±0.25c	17.15±0.31bd	16.48±0.47b
	≥20 mm	20.14±0.33d	18.92±0.40d	20.64±0.66d	19.28±0.62d	20.8±1.40d	17.5±1.57acd	18±1.81b
TOT	<10 mm	12.02±0.21	12.62±0.17	12.38±0.16	12.61±0.18	12.42±0.20	12.5±0.23	11.91±0.31
	≥10-<15 mm	11.61±0.08**	12.51±0.09*	12.85±0.10*	12.57±0.11*	12.51±0.13*	12.05±0.17	12.17±0.22
	≥15<20 mm	11.75±0.11**	12.35±0.13*	12.74±0.16*	12.73±0.19*	13.06±0.26*	12.07±0.33	11.84±0.49
	≥20 mm	11.03±0.34	13.03±0.42	12.50±.70	13.24±0.65	12.6±1.47	14±1.64	11±1.89
SVZ	<10 mm	10.07±0.21	10.18±1.15	10.16±0.10	10.04±0.14	9.96±0.16	10.05±0.22	10.08±0.18
	≥10-<15 mm	10.05±0.22	10.21±0.25	10.14±2.48	10.03±0.22	10.09±1.86	9.92±0.18	9.85±0.2.48
	≥15<20 mm	10.08±0.14	10.13±0.12	10.14±0.11	9.91±0.13	9.96±1.87	9.64±0.11	9.86±0.14
	≥20 mm	9.97±0.11	9.97±0.1	10.32±0.13	10.24±0.15	9.8±0.12	9.5±0.11	10±0.12

ISCU: Intervallo svezzamento-1°calore utile; IP: Interparto; P2: misura dello spessore di grasso a fine gravidanza successiva; TOT: N°di suinetti nati totale; SVZ: n°di suinetti svezzati. Lettere uguali (a,b,c,d) sulle righe all'interno di ogni ordine di parto escludono una differenza significativa (P<00.5) tra classi di spessore a fine lattazione. La presenza di un N° di asterischi diverso sulle righe (*;**;***) dall'interno di ogni classe di spessore a fine lattazione indica una differenza significativa tra l'ordine di parto.

Grafico 1. Variazione del N° totale di suinetti in dipendenza dell'ordine di parto e di classi di IS-1°CU.

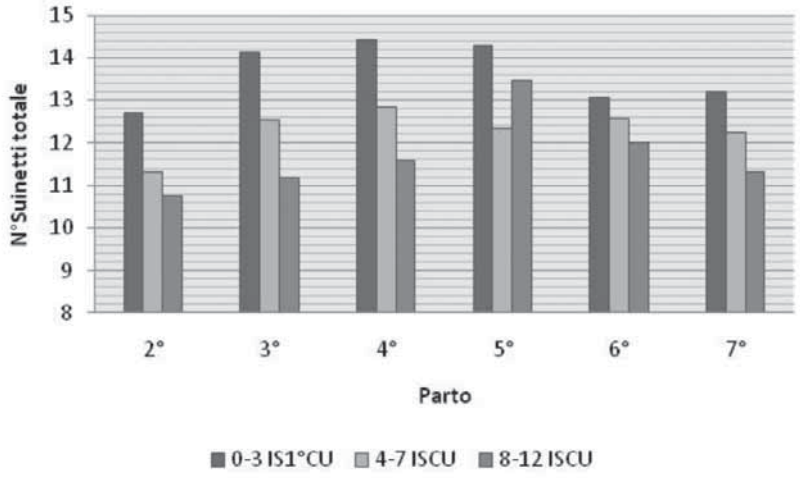


Figura 1. Variazione dello spessore di lardo a fine gravidanza in dipendenza dell'ordine di parto e del mese dell'anno

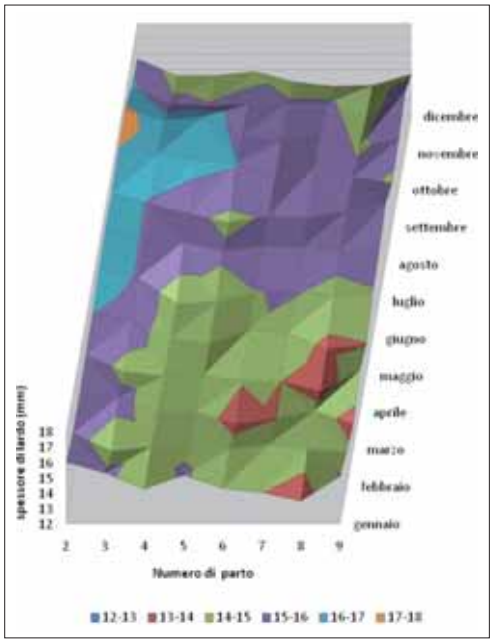


Figura 2. Variazione dello spessore di lardo a fine lattazione in dipendenza dell'ordine di parto e del mese dell'anno

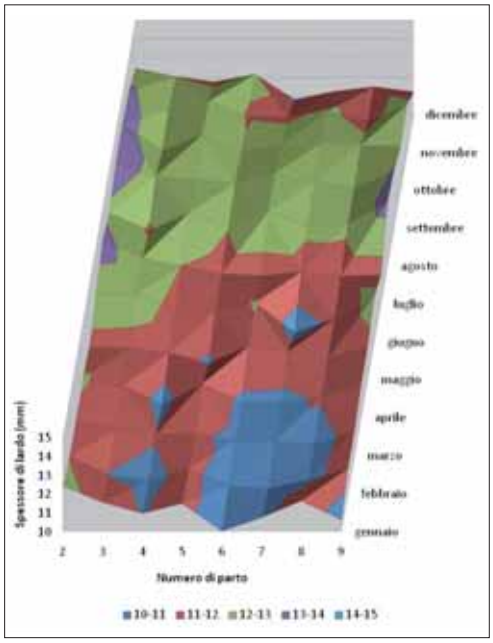


Grafico 3. Valori dello spessore di lardo a fine lattazione in dipendenza dell'ordine di parto e di classi di IS-1°CU.

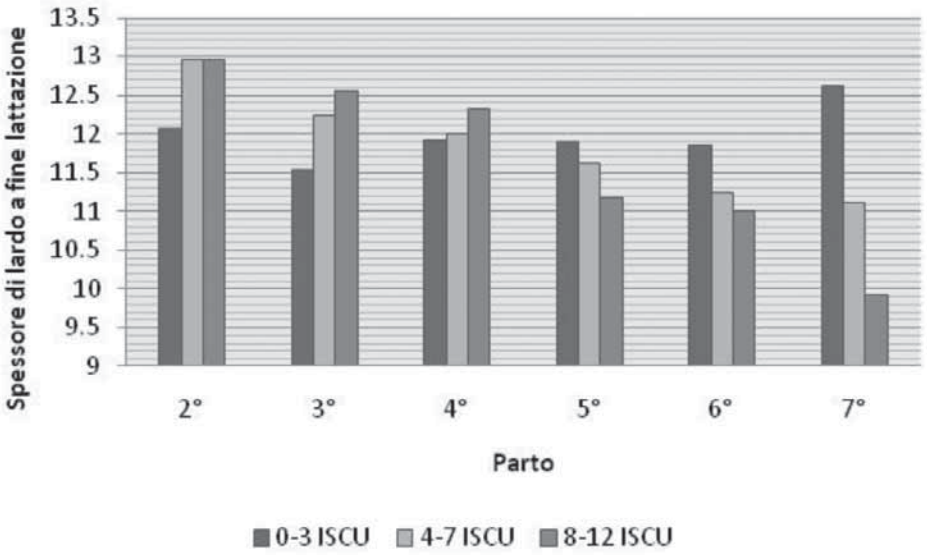
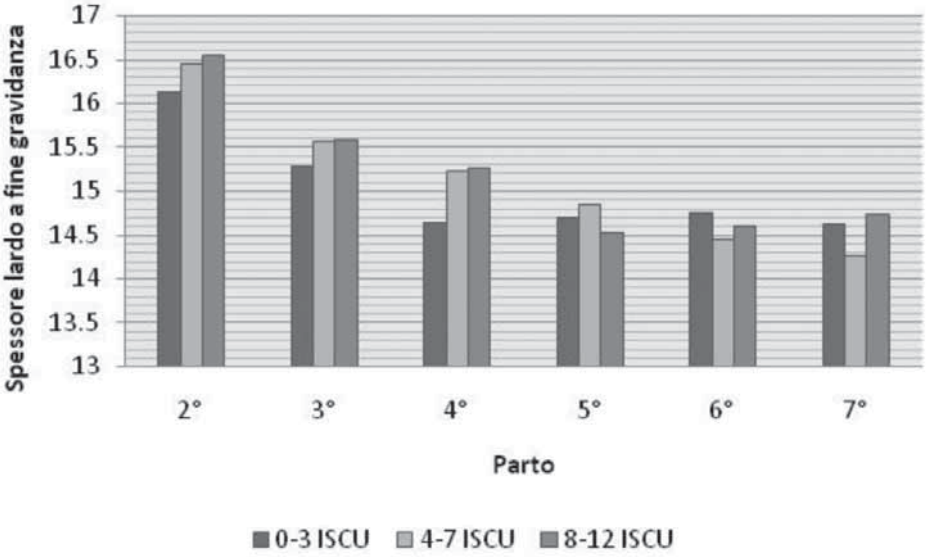


Grafico 2. Valori dello spessore di lardo a fine gravidanza in dipendenza dell'ordine di parto e di classi di IS-1°CU.



CONCLUSIONI

Lo spessore di lardo facilmente valutabile nella pratica di allevamento può dare utili indicazioni sulla gestione delle fasi produttive delle scrofe. Tali valutazioni risultano essere di estremo interesse a fine lattazione quando si presentano condizioni metaboliche fortemente influenzate dall'ordine di parto e dallo stato di ingrassamento. La maggiore conoscenza della gestione del periodo peri-svezzamento può diminuire l'IS-1°CU e ottimizzare il tasso di utilizzazione delle strutture di allevamento.

Bibliografia

Aherne FX, Williams IH (1992). Nutritional for optimizing breeding herd performance. Vet Clin N Am Food Anim Pract 8.589-608.

Guedes RMC, Nogueira RHG (2001) The influence of parity order and body condition and seru hormones on weaning-to-estus interval of sows. Anim Reprod Scie 67.91-99

Lucy MC. (2008). Functional differences in the growth and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post partum nutrition and reproduction. Reprod Dom Anim 43 (suppl.2).31-39.

Polese E., Bernardi ML, Amaral Filha, Wentz I., Bortolozzo FP. (2006) Consequences of variation in weaning-to-estus interval on reproductive performance of swine females. Livestock Science 103.124-130.

Schneider JD, Tokach MD, Dritz SS, Nelssen JL, Derouchey JM, Goodband RD. (2007) Effects of feeding schedule on body condition, aggressiveness, and reproductive failure in group-housed sows. J Anim Sci. 85.3462-3469

Tummaruk P, Tantasuparuk W, Techakumphu M, Kunavongkrit A. (2007) Age, body weight and backfat thickness at first observed oestrus in crossbred Landrace x Yorkshire gilts, seasonal variations and their influence on subsequence reproductive performance. Anim Reprod Sci. 99.167-181.

EFFETTO DI MANNANO-OLIGOSACCARIDI (BIOMOS™) SULLE PERFORMANCES DI SUINETTI IN ACCRESCIMENTO ALIMENTATI CON DIETE A BASSO TENORE PROTEICO: STUDIO PRELIMINARE

EFFECT OF MANNAN-OLIGOSACCHARIDES (BIOMOS™) ON THE PERFORMANCES OF PIGLETS FED WITH DIETS AT A LOW PROTEIN LEVEL: PRELIMINARY TEST

ELENA VALLINO COSTASSA(*), ROBERTO PIOVANO (**), GIUSEPPE BARICCO (***)

(*)Specialization School in Swine Pathology, University of Turin , Italy, perciformi83@yahoo.it

(**)Specialization School in Swine Pathology, University of Turin, Italy, bianconero2@libero.it

(**) Contract Professor, Specialization School in Swine Pathology, University of Turin (I), giuseppe@baricco.it

Parole chiave: suinetti, mannano-oligosaccaridi, MOS,performances

Key words: piglets, mannan oligosaccharides, MOS, performances

Riassunto. Le direttive europee che regolamentano le emissioni di azoto provenienti da animali allevati in azienda aprono una finestra importante sull'uso di mangimi a basso tenore proteico, allo scopo di ridurre le emissioni azotate nell' ambiente.
Una diminuzione delle proteine alimentari però, spesso ha conseguenze negative sulle performances di crescita, per cui lo scopo di questo lavoro è stato di valutare se l'aggiunta di un concentrato di MOS, mannano-oliogosaccaridi (BioMos™) alle diete ipoproteiche (LPBM) somministrate a suinetti dopo lo svezzamento possa dare risultati positivi in tasso di crescita, consumo di cibo, indice di conversione dell'alimento ed efficienza proteica, mortalità e indice terapeutico, confrontando i dati ottenuti con quelli di una uguale dieta ipoproteica non addizionata di MOS (LP), e con una di controllo dal normale contenuto proteico (CTRL). I risultati mostrano come BioMos™ migliori i parametri zootecnici e l'efficienza nella trasformazione delle proteine presenti nella dieta.

Abstract. European directives about nitrogen output from farms open an important window for the use of low protein feeds in breeding animals, to reduce environmental pollution. On the other hand, a reduction of dietary protein level might have negative consequences on growth performances, so the aim of this study is to evaluate if the addiction of BioMos™ (mannan-oligosaccharide product), to low protein diets (LPBM), in piglets after weaning, gives positives results in : growth rate, feed consumption, conversion rate, protein efficiency index, mortality and therapeutic index, by comparison with low protein (LP) and control diets (CTRL). The results show that BioMos™ improves the zootechnical parameters of performance, and notably the efficiency of the transformation of dietary protein.

1. INTRODUZIONE

Molti studi in letteratura mostrano come una sostanziale riduzione del tenore proteico nelle diete di animali d'allevamento, bilanciate con gli aminoacidi essenziali, permetta una significativa riduzione delle emissioni di azoto provenienti dalle aziende agricole(1-13).
Spesso però le performances di animali alimentati con diete standard sono superiori a quelle di animali alimentati con diete a basso tenore proteico. Infatti frequentemente, utilizzando questi mangimi "ecologici" in condizioni operative o pratiche, questo concetto viene spesso confermato: le diete povere in proteine, anche se accuratamente ribilanciate in energia ed amino acidi essenziali, non sempre confermano il tasso di crescita e le performances degli animali rispetto alle diete standard. A margine di queste considerazioni occorre però dire che in determinate condizioni (ricorrenza di problemi intestinali nell'allevamento), la riduzione del tasso proteico nel mangime aiuta a mantenere un buono stato di salute a livello intestinale, contribuendo a migliorare risultati nelle prestazioni produttive rispetto alle diete standard.
La direttiva 91/676 (c.d. "Direttiva Nitrati") relativa all'inquinamento da azoto apre dunque numerose possibilità per un uso più esteso di diete ridotte in tenore proteico, particolarmente nell'allevamento suino.
Lo scopo di questo studio è di valutare se l'aggiunta di un prodotto a base di MOS, mannano-oligosaccaridi (BioMos™, Alltech Inc., Nichoolasville, US) alla dose di 1,5 kg per tonnellata di mangime formulato a ridotto tenore proteico può influire sulle performances zootecniche nella prima fase di accrescimento dei suinetti, rispetto a una dieta standard a normale contenuto proteico (CTRL) ed ad una uguale dieta a basso tenore proteico (10% di proteina grezza in meno rispetto al CTRL) priva di MOS aggiunti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Management
La prova è stata realizzata a Chieri (TO) da Ottobre a Novembre 2008, presso un'azienda di 200 scrofe di genetica (Lw x Ldr) x Lw, da cui sono stati selezionati, a fine della fase di svezzamento, 90 lattonzoli (del peso di 16- 18 Kg) , assegnati quindi a tre diversi gruppi sperimentali.

2.2. Nutrizione
I suinetti sono stati alimentati o con una dieta di controllo standard (formulata per suinetti tra 15 e 30 kg di peso, CTRL) o con una dieta a basso tenore proteico (con la proteina grezza ridotta del 10% rispetto al CTRL, ribilanciata con gli amino acidi essenziali, LP).
Per il terzo gruppo sperimentale , la dieta LP è stata arricchita con 1,5 Kg/ton di BioMos™ (LPBM).
I valori nutrizionali e le formulazioni dei mangimi sono stati sintetizzati nelle tabelle 1.a e 1.b.

Tab.1.a. Valori nutrizionali delle diete

	CTRL		LP		LPBM	
	Calcolati	Analizzati	Calcolati	Analizzati	Calcolati	Analizzati
Proteina grezza %	18.01	17.95	16.45	16.52	16.45	16.45
Grassi %	5.62	5.45	5.71	5.32	5.71	5.40
Fibra grezza %	3.61	3.62	3.52	3.58	3.52	3.65
Ceneri grezze %	5.25	5.02	5.00	5.10	5.00	5.20
DE Kcal/kg	3334	--	3324	--	3324	--
Lisina g/kg	11.6	--	11.8	--	11.8	--
Met+Cis g/kg	7.04	--	6.97	--	6.97	--
Treonina g/kg	7.11	--	7.12	--	7.12	--
Triptofano g/kg	2.26	--	2.28	--	2.28	--

Tab.1.b. Composizione delle diete

	CTRL	LP/LPBM
Mais	21,4	25.79
Grano	20	20
Orzo	20	20
Soia 48%	15	10
Cruschello g.t.	6.5	6.5
Soia estrusa	4	4
Farina di pesce (sost.)	2.5	2.5
Siero di latte/grasso 50/50	2.5	2.5
Yogurth essiccato	2.5	2.5
Olio di soia	1.5	1.5
Carbonato di Ca	1.05	1.05
Fosfato bicalcico	0.75	0.75
Miscela di acidi organici	0.6	0.6
Lisina liq. 50%	0.5	0.8
NaCl	0.35	0.35
Integratore vitaminico	0.53	0.53
Metionina MHA liq.	0.12	0.17
Fitasi	0.1	0.1
Treonina	0.05	0.13
Enzima px	0.05	0.05
Triptofano	--	0.03
BioMos	--	0.15 (solo nella LPBM-mais)

2.3. Prova sperimentale

Appena terminato lo svezzamento, 45 suinetti di circa 50 giorni d'età sono stati divisi equamente in 3 gruppi sperimentali .

La prova si è svolta in 2 replicazioni, per un totale di 90 suinetti coinvolti.
I soggetti sono stati scelti per mantenere uniformità di sesso e peso; sono stati poi suddivisi nei 3 gruppi casualmente e l'assegnazione ai regimi sperimentali è stata effettuata a random.
I suinetti sono stati pesati individualmente all'inizio e alla fine della prova, mentre i consumi di cibo sono stati misurati per ogni box.
All'inizio della prova, i suinetti della seconda replicazione avevano un peso vivo medio maggiore di quelli della prima replicazione (18,4 kg p.v. vs 16,77 kg p.v.); questa era dovuto al fatto che, dopo la selezione dei 90 suinetti il controllo della seconda replicazione è iniziato una settimana dopo la prima (per una durata dell'esperimento di 20 gg vs 27 gg.).

Per ogni gruppo si è calcolato:

- Il tasso di crescita (per ogni singolo animale si è registrato l'incremento di peso giornaliero);
- Indici di consumo di alimento e conversione alimentare misurati per box (durante tutto il periodo di monitoraggio e per tutti i soggetti; dato numerico);
- Indice di efficienza proteica (kg di crescita/ kg di proteina ingerita ; dato numerico);
- Tasso di mortalità (i mangimi non sono stati medicati) con diagnosi di morte;
- Indice terapeutico (si è valutato il bisogno specifico di trattamenti antibiotici individuali).

*2.4. Analisi statistich*e

Le analisi statistiche sono state effettuate sui dati di crescita individuali col software R 2.3.0. La distribuzione normale dei dati è stata messa a punto dal test della normalità di Shapiro Wilk. I dati sono stati analizzati usando il test di Bartlett sull'omogeneità della varianza. Il livello di significatività è P< 0,05.

3. RISULTATI

3.1. Tassi di crescita

I tassi di crescita medi sono mostrati nella tabella 2:

Tab.2: Tassi di crescita

	LPBM	LP	CTRL
Media tasso di crescita/gg (n=30) , kg (*)	0.632 (a)	0.598 (b)	0.572 (c)
SD +/-	0.100	0.108	0.133

(*) a,b,c = lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa per P<0,05. Nota: nell'analisi statistica,il suinetto 441 nel gruppo LPBM (che ha avuto una sovracrescita di kg.0,94/gg) non è stato considerato, in quanto rappresentava un' osservazione outlier.

3.2. Indice di consumo di alimento e di conversione alimentare

I consumi di alimento e il tasso di conversione sono mostrati nella tabella 3:

Tab.3: Consumi di alimento e indice di conversione

	LPBM	LP	CTRL
Consumo totale di mangime kg	797.44	792.04	790.32
Crescita totale kg	443.34	418.76	403.05
Indice di conversione alimentare	1.798	1.891	1.958
Kg peso aggiunto / Kg alimento %	55.61	52.88	51.07
Valore relativo %	108.9	103.5	100.0

3.3. Indice di efficienza proteica

Gli indici di efficienza proteica sono mostrati nella tabella 4:

Tab.4. Indici di efficienza proteica

	LPBM	LP	CTRL
Crescita totale kg	443.34	418.76	403.05
Proteina totale ingerita kg	131.57	130.68	142.25
Indice di Efficienza Proteica	3.37	3.20	2.84
Valore relativo %	118.7	112.7	100.0

3.4. Tassi di mortalità e indici terapeutici

Nessun suinetto è deceduto durante la prova. A tutti è stata effettuata un'iniezione i.m. di Naxcel al giorno 1, e non sono stati necessari ulteriori trattamenti.
Il gruppo CTRL, durante il periodo di monitoraggio, ha prodotto feci meno consistenti e poco formate rispetto agli altri due gruppi.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

In questa prova, il mangime a basso tenore proteico (LP) – ridotto del 10% nel contenuto di proteina grezza (16,5% vs 18%) e ribilanciato in lisina, aminoacidi solforati, treonina e triptofano , quando è stato somministrato ai suinetti nella prima fase di ingrasso dopo lo svezzamento per 23 giorni, ha dato risultati migliori, sia in termini di crescita sia in tasso di conversione dell'alimento, rispetto alla dieta di controllo.
In questa prova non è stata evidenziata alcuna perdita nelle performances di crescita dovute alla dieta a basso tenore proteico, nonostante questo sia stato spesso evidenziato in letteratura. Al contrario, la dieta a basso tenore proteico ha dato migliori risultati, probabilmente per la presenza di un eccesso di proteine parzialmente indigerite nell'intestino dei suinetti appartenenti al gruppo di controllo.

La dieta LPBM (dieta a basso tenore proteico identica alla LP , alla quale è stato aggiunto 1,5 kg/ton di BioMos™) ha dato notevoli risultati in confronto a quelli della dieta CTRL: LPBM ha determinato un maggior incremento delle performances (IPG g. 632 vs 572, P<0,05, valore relativo 110,5 vs 100,0), ed un miglior indice di conversione dell'alimento (resa del mangime 55,61% vs 51,07%, valore relativo108,9 vs 100).
La ragione per cui un complesso mannano - oligosaccaride come il BioMos™ possa dare prestazioni particolarmente buone in diete con bassa proteina, allo stato delle nostre conoscenze può essere solo supposto: si può ipotizzare che il minor contenuto di proteine a livello intestinale possa determinare un abbassamento del pH nel lume , e attraverso questa azione agire sinergicamente con i MOS nel favorire la crescita di batteri intestinali utili, come i *Lattobacillus* spp., e nel contrastare quella di batteri putrefattivi sfavorevoli come *Clostridium* e *Salmonella* spp.
In termini economici il costo della dieta CTRL nell'Ottobre 2008 era di 281 €/ton, mentre quella LP era di 288 €/ton e la LPBM di 293€/ton; questo significa che per ogni kg di peso guadagnato per suino, si sono investiti in alimento rispettivamente 0,550€ per il CTRL, 0,544 € per la LP e 0,527€ per la LPBM,con valore relativo uguale a 100 nel CTRL, 98,9 nella LP e 95,8 nella LPBM.
La totale applicazione della 91/676/CE nei paesi europei imporrà strette limitazioni alle aziende agricole intensive localizzate nelle cosiddette "zone vulnerabili" nello sviluppare e proseguire la loro attività: saranno necessari notevoli investimenti economici per un trattamento più tecnologico dei liquami o notevoli riduzioni del numero dei capi allevati, pur non essendo queste le uniche opzioni disponibili.
La scienza della nutrizione animale infatti ha mostrato che la riduzione della proteina nell'alimento permette di ridurre le emissioni azotate che inquinano l'ambiente con una ratio di almeno 1:1,5. Ciò significa che per ogni riduzione del 10% dal totale contenuto proteico dell'alimento, è possibile ridurre almeno del 15% le emissioni azotate dell'allevamento. Questo dato è stato confermato nella nostra prova: le diete a basso contenuto proteico, bilanciate con gli aminoacidi essenziali, permettono agli animali di utilizzare meglio il contenuto proteico rispetto alle altre diete.
L'indice di efficienza proteica misurato nella nostra prova ha mostrato come, nella dieta LP, ogni kg di proteina ingerita induca un incremento del peso di 3,2 kg, mentre nella dieta CTRL l'incremento non va oltre i 2,84 kg (valore relativo di 112,7 vs 100). Nella dieta LPBM invece l'incremento di peso è salito a 3,37 kg per ogni kg di proteina ingerita presente nella dieta (valore relativo 118,7 vs 100 per il CTRL). Pertanto i valori relativi degli indici di efficienza proteica possono essere un pratico e semplice mezzo di previsione del potenziale impatto ambientale che hanno i diversi regimi alimentari adottati nelle moderne aziende agricole ad allevamento intensivo, considerando che ciò che non è utilizzato per l'incremento di peso, viene eliminato in una forma o nell'altra all'esterno dall'animale stesso.
In questa prova il BioMos™ ha dato grandi benefici in termini di efficienza quando aggiunto in diete a basso tenore proteico, somministrate a suinetti in fase di crescita (da 15 a 30 kg).
Le capacità dei glucomannani di favorire la crescita della microflora intestinale sono già conosciute e sembrano trovare condizioni particolarmente favorevoli quando il contenuto proteico della dieta è limitato.

4. Bibliografia

1. Daiwen Chen." Environmental *challenges* of animal production and the role and task of animal nutrition in environmental protection". 2000, APEC *China Seminar*, Oct. 15-19. Beijing, China.
2. Xiccato G., Schiavon S., Gallo L., Bailoni L., Bittante G. (2005)"Nitrogen excretion in dairy cow, beef and veal cattle, pig and rabbit farms in Northern Italy". J An Sci; 4, 103-112.
3. Ball, R.O., and S. Möhn.(2003)"Feeding strategies to reduce greenhouse gas emissions from pigs". *Adv. Pork Prod*.14:301–311.
4. O. Grant Clark, S. Moehn, I. Edeogu, J. Price, J. Leonard.(2005) "Manipulation of Dietary Protein and Nonstarch Polysaccharide to Control Swine Manure Emissions" .*J Environ Qual*, 34:1461-1466.
5. In. K Han, J. H. Lee. "Feeding and management system to reduce environmental pollution in swine". *2000,* APEC *China Seminar*, Oct. 15-19. Beijing, China.
6. Hansen J. A. ,Nelssen JL, Goodband RD, Weeden TL.(1993)"Evaluation of animal protein supplements in diets of early-weaned pigs". *J Anim Sci Jul*;71(7):1853-62.
7. Castaing J.,Cambeilh D.(1998)" Incidence d'une réduction du taux azoté dans des aliments à base de céréales et équilibrés en acides aminés,pour porcelets sevrés". J. Rech. Porc. Fra. 30:217-222.
8. Albar j., Granier R.(1996)" Incidence du taux azoté de l'aliment sur la consommation d'eau, la production de lisier et les rejets azotés en engraissement". J. Rech. Porc. Fra., 28: 257-266.
9. Hobbs, P.J. : Pain, B.F. : Kay, R.M. : Lee, P.A (1996)" Reduction of odorous compounds in fresh pig slurry by dietary control of crude protein" *J. sci. food agric*.; 71:508-514.
10. J. A. Shriver, S. D. Carter, A. L. Sutton, B. T. Richert, B. W. Senne,L. A. Pettey (2003)" Effects of adding fiber sources to reduced-crude protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen excretion, growth performance, and carcass traits of finishing pigs ";*J. Anim*. Sci. 81:492-502.
11. K.I. Kumm (2003) "Ways to reduce nitrogen pollution from Swedish pork production" *Nutrient Cycling in Agroecosystems*;66:285-293.
12. S. Zervas ,R. T. Zijlstra (2002)"Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs" *J. Anim*. Sci. 80:3247-3256.
13. E. R. Otto, M. Yokoyama, P. K. Ku, N. K. Ames; N. L. Trottier.(2003)" Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration" *J. Anim. Sci.* 81:1743-1753.

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN SUINI DI TRE SETTIMANE DI ETÀ IN DIVERSI PAESI EUROPEI

VILLARREAL, I. *[1], JENSEN, J.C.E.[2], NANJIANI, I.A.[3], MAES, D.1

*[1]Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium; [2]Pfizer Ltd. EUAfME, 23-25 avenue du Docteur Lannelongue F-75668 Paris Cedex 14, [3]Pfizer Ltd. VMRD, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ *Corresponding Author*

Parole chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, prevalenza, nPCR, tamponi nasali, suinetti sottoscrofa.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae* sono diffuse in tutto il mondo e causano le maggiori perdite nell'industria suinicola. Il controllo di *M. hyopneumoniae* può essere raggiunto ottimizzando il management e le pratiche di allevamento tramite medicazioni antibiotiche e vaccinazioni. In molti paesi europei, più della metà degli allevamenti applica la vaccinazione per controllare l'infezione (Maes et al., 2008). Vengono impiegati differenti programmi vaccinali, ma in molti casi, i suinetti vengono vaccinati una o due volte in sala parto o allo svezzamento.

Per implementare appropriate misure di controllo e ottimizzare ulteriori strategie vaccinali,è importante indagare l'andamento dell'infezione da *M. hyopneumoniae* negli allevamenti suini e, più specificamente, valutare la prevalenza e l'importanza delle infezioni che avvengono nei suinetti. Studi in un limitato numero di allevamenti in alcuni paesi hanno dimostrato che, per mezzo della nested PCR (nPCR) su tamponi nasali (Vicca et al., 2002; Calsamiglia et al., 1999), il 5-20% dei suinetti risultano positivi a *M. hyopneumoniae* (Palzer et al., 2006) allo svezzamento o poco dopo lo svezzamento.

L'obiettivo di questo studio è stato di verificare la prevalenza delle infezioni da *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età in diversi paesi europei, analizzando i tamponi nasali con nPCR.

MATERIALI E METODI

Allevamenti nello studio

Lo studio è stato condotto in 9 paesi europei: Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Ungheria, Italia, Olanda, Polonia e Spagna. In ciascun paese sono stati inclusi 6 allevamenti a ciclo chiuso o a ciclo aperto. Le aziende hanno dovuto soddisfare certi criteri di selezione come una dimensione d'allevamento di almeno 100 scrofe, presenza di problemi clinici correlati a *M. hyopneumoniae*, il non uso di antibiotici attivi verso *M. hyopneumoniae*, età dei suinetti inferiore a 3 settimane e disponibilità a cooperare con lo studio. Sono stati selezionati a random 30 suinetti da ciascun allevamento da scrofe il più differenti possibile. Le scrofe sono state raggruppate in 3 classi, cioè di 1° parto, 2-5° parto e oltre (>5° parto) .

Tamponi nasali

In ogni allevamento, sono stati raccolti 30 tamponi nasali da suinetti di 21±3 giorni di età. I tamponi nasali sono stati ottenuti raschiando in profondità la mucosa nasale di ogni narice. Questa procedura è adeguata per la ricerca di *M. hyopneumonia*e nella pratica clinica di routine, data la facilità della raccolta di campioni nelle condizioni di campo (Otagiri et al., 2005). I tamponi nasali di ciascun paese sono stati congelati e inviati in ghiaccio secco per la successiva ricerca di *M. hyopneumoniae* nel laboratorio.

Analisi dei tamponi nasali

Il materiale raccolto in ciascun tampone nasale è stato messo in sospensione in 200µl PBS e il DNA è stato estratto secondo il protocollo standard QIAGEN per la purificazione del DNA totale da sangue e tessuti animali (QIAGEN, DNAeasy Blood & Tissue Kit, Belgium). Per la ricerca del DNA di *M. hyopneumoniae* è stato impiegato un test nPCR basato su un protocollo modificato descritto da Stärk et al. (1998) . I prodotti della Nested PCR sono stati analizzati con elettroforesi su gel al 1.5% di agarosio in tampone di TBE e visualizzato sotto illuminazione UV dopo colorazione in GelRed™ (Biotium, Inc., CA, USA).

RISULTATI

Nella Tabella 1 viene presentato il numero di allevamenti e animali positivi dei diversi paesi. La percentuale totale di allevamenti e suini positivi è stata rispettivamente del 63% e 11%. A parte Belgio e Polonia per cui la campionatura è in corso, Germania, Italia e Olanda sono risultati i paesi con il più alto numero di allevamenti positivi per M. hyopneumoniae. La più alta percentuale di suini positivi nei paesi con un completo campionamento è stata in Germania e Italia.

Tabella 1. Il numero di allevamenti e suinetti (allo svezzamento) positivi per M. hyopneumoniae da nPCR su tamponi nasali nei diversi paesi EU

	Nr di allevamenti selezionati	% allevamenti positivi	Numero totale di suinetti (30 suinetti/allevamento)	% suinetti positivi
Belgio*	1	0%	0	0%
Danimarca	6	50%	3	2%
Francia*	4	100%	26	22%
Germania	6	80%	35	19%
Ungheria	6	50%	18	10%
Italia	6	80%	40	22%
Olanda	6	80%	14	8%
Polonia*	2	0%	0	0%
Totale	43	63%	145	11%

* Paesi in cui è ancora in corso la raccolta dei campioni

DISCUSSIONE

Il presente studio ha valutato la prevalenza di *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età in diversi paesi europei. I risultati hanno mostrato che nella maggior parte degli allevamenti, vi è stata già una evidenza di infezione da *M. hyopneumoniae* in suinetti di 3 settimane di età con un significativo numero di animali risultati positivi. Questo suggerisce che le infezioni precoci da *M. hyopneumoniae* sono importanti negli allevamenti selezionati (Fano et al., 2005; Sibila et al., 2004, 2007). Poiché sono stati usati criteri specifici per selezionare gli allevamenti, i risultati non possono essere generalizzati come tutti gli allevamenti di suini in EU, ma solo come le aziende adatte ai criteri di selezione. Tuttavia, in termini di management e condizioni di allevamento, le aziende selezionate possono essere considerate rappresentative per molti altri allevamenti di suini in EU.

E' stata usata la Nested PCR su tamponi nasali per analizzare i campioni . Questo strumento diagnostico permette di rilevare meno di cinque organismi in un campione e il test è utile per monitorare le infezioni da *M. hyopneumoniae* in condizioni di campo (Thacker, 2004; Otagiri et al., 2005). I risultati dovrebbero essere interpretati a livello dell'allevamento, non a livello individuale (Otagiri et al., 2005). Poiché il naso non è il sito primario di moltiplicazione di *M. hyopneumoniae* , è probabile che i presenti risultati sottostimino il numero di animali infetti. In questo senso, si potrebbe ottenere una prevalenza più elevata esaminando il liquido del BAL (Verdin et al., 2000) poichè *M. hyopneumoniae* si attacca e si moltiplica sull'epitelio ciliato della trachea , dei bronchi e dei bronchioli (Zielisnki et al.,1993). Prelevare il BAL è possibile in condizioni di campo, ma è tuttavia meno pratico e richiede più tempo che prelevare tamponi nasali . La sierologia non funzionerebbe nel presente studio poichè è impossibile distinguere tra anticorpi dovuti all'infezione e anticorpi materni. Inoltre, richiede almeno 4-6 settimane prima che i suini infetti possano mostrare anticorpi riscontrabili nel siero. La difficoltà di coltivare *M. hyopneumoniae* dai tamponi nasali potrebbe indicare se i suini sono stati infettati con organismi vivi di *M. hyopneumoniae* . Tuttavia la coltura di *M. hyopneumoniae* è assai difficile, costosa e richiede parecchio tempo, anche se vengono usati tessuto polmonare infetto o liquidi dal BAL. Pertanto, i tamponi nasali non sono adatti per la coltura di *M. hyopneumoniae*.
Una volta che i campionamenti di tutti gli allevamenti nei diversi paesi siano stati completati, si ricercherà quali fattori dell'allevamento siano significativamente correlati con la prevalenza dell'infezione nell'azienda e nell'animale. L'identificazione e la quantificazione di questi fattori di rischio permetterà di capire meglio l'epidemiologia delle infezioni precoci da *M. hyopneumoniae* negli allevamenti europei e di ottimizzare le misure di controllo.

Ringraziamenti
Gli autori ringraziano l'inestimabile assistenza di Hanne Vereecke, i veterinari e gli allevatori coinvolti nello studio, lo staff tecnico di campo e di Sandwich di Pfizer che ha facilitato la raccolta ed il trasporto dei campioni.

Bibliografia

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

Fano E, Pijoan C, Dee S. Mycoplasma hyopneumoniae prevalence at weaning as a predictor of the groups' subsequent Mycoplasma status. Allen D. Leman Swine Conference-Proceedings, 2005: 109-113.

Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs. Vet Microbiol 2008 Jan 25;126(4):297-309.

Otagiri Y, Asai Tm Okada M, et al. Detection of Mycoplasma hyopneumoniae in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. J. Vet. Med. Sci. 2005 67(8): 801-805.

Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. **Pathogenesis of pneumonic diseases in pigs of different age groups in bronchoalveolar lavage fluid.** IPVS Copenhagen 2006, p.289, Proc. Vol 2 (University of Munich).

Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen JC. Dynamics of Mycoplasma hyopneumoniae infection in 12 farms with different production systems. Can J Vet Res 2004 Jan;68(1):12-8.

Sibila M, Nofrarias M, Lopez-Soria S, et al. Exploratory field study on Mycoplasma hyopneumoniae infection in suckling pigs. Vet Microbiol 2007 Apr 15;121(3-4):352-6.

Stark KD, Nicolet J, Frey J. Detection of Mycoplasma hyopneumoniae by air sampling with a nested PCR assay. Appl Environ Microbiol 1998 Feb;64(2):543-8.

Thacker EL. Diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae. Anim Health Res Rev 2004 Dec;5(2):317-20.

Verdin E, Saillard C, Labbe A, Bove JM, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae in tracheobronchiolar washings from pigs. Vet Microbiol 2000 Sep 15;76(1):31-40

Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, de KA. Patterns of Mycoplasma hyopneumoniae infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2002 Sep;49(7):349-53.

Zielinski, G. C. & Ross, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am J Vet Res (1993). 54, 1262–1269.

L'EPATITE E (HEV) NEI SUIDI: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSI E FILOGENESI

HEPATITIS E (HEV) IN SUIDS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND PHYLOGENESIS

FRANCESCA MARTELLI [1], ILARIA DI BARTOLO [2], NADIA INGLESE [2], ANDREA CAPRIOLI [3], FRANCO MARIA RUGGERI [2], FABIO OSTANELLO [1]

[1] *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna;*
[2] *Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*
[3] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

Parole chiave: Virus dell'epatite E (HEV), Suino, Epidemiologia, Diagnosi Analisi filogenetica

Key words: Hepatitis E Virus (HEV), Swine, Epidemiology, Diagnosis, Philogenetic analysis

Riassunto. L'epatite E nell'uomo è una malattia virale responsabile di forme cliniche di epatite acuta. 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. Dalla prima identificazione nel suino nel 1997, l'infezione da HEV è attualmente considerata endemica negli allevamenti suinicoli di numerosi paesi, Italia compresa. Nel suino, l'infezione da HEV sembra evolvere in maniera asintomatica, ma rimane da chiarire l'eventuale ruolo di HEV in patologie multifattoriali come PCV2 e PRRS. Nel presente lavoro vengono riportati in sintesi i risultati relativi all'epidemiologa dell'infezione da HEV in Italia nel suino e nel cinghiale e la filogenesi dei ceppi messi in evidenza. Prevalenze di infezione elevate sono state identificate sia nel suino (42%) che nel cinghiale (25%), ma non è stato possibile associare la presenza di HEV con altre patologiaìe batteriche e virali concomitanti.

Summary. Hepatitis E is in humans a viral disease responsible of clinical acute hepatitis. Several evidence support the hypothesis that hepatits E is an emerging zoonosis, and that pigs could be the main animal reservoir. Since the first identification in 1997, HEV infection is now considered endemic in swine herds in several countries, Italy included. In pigs, the infection seems to be asymptomatic, but the possible role of HEV in multifactorial diseases such as PCV2 and PRRS remain still to be clarified. In this study we present data on the epidemiology of the infection in pigs and wild boars in Italy, and on the phylogenesis of the strains identified. High prevalence rate has been identified both in pigs (42%) and in wild boars (25%), but it hasn't been possible associating the infection with concomitant viral and bacterical diseases.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è responsabile di infezioni, apparentemente asintomatiche, nel suino e in altri mammiferi domestici. I ceppi di HEV evidenziati nei mammiferi presentano spiccate analogie genetiche con quelli messi in evidenza nell'uomo e responsabili di forme di epatite acuta generalmente non soggetta a cronicizzazione. Attualmente si ritiene che l'infezione da HEV sia una zoonosi emergente e che il suino possa rappresentare, in alcuni contesti geografici, il principale serbatoio di infezione per l'uomo (Okamoto, 2008).
HEV è un virus a RNA di piccole dimensioni (27-34 nm), privo di envelope; è resistente alle variazioni di pH, sopravvive all'acidità gastrica ma non alle elevate concentrazioni saline. I ceppi di HEV presentano una notevole diversità genomica e vengono classificati in 4 genotipi, a loro volta distinti in sottotipi. I genotipi 1 e 2 comprendono ceppi virali quasi esclusivamente di origine umana e si presentano più conservati tra loro, mentre i genotipi 3 e 4, circolanti sia nell'uomo che negli animali, hanno una variabilità genetica superiore e una maggiore diffusione geografica. A tutt'oggi viene riconosciuto un solo sierotipo (Lu et al., 2006).
Nei Paesi in via di sviluppo (PVS) di gran parte dell'Asia, Nord Africa, Medio Oriente e America centro-meridionale l'infezione umana è endemica e si manifesta con focolai di vasta portata generalmente conseguenti alla contaminazione delle fonti idriche (Okamoto, 2008). Nei Paesi industrializzati, la malattia si manifesta sporadicamente ed è generalmente la conseguenza di infezioni contratte durante soggiorni nelle aree endemiche (casi di importazione). Tuttavia, sono in aumento le segnalazioni di casi di epatite E in soggetti che non hanno viaggiato in zone a rischio (casi autoctoni) e i ceppi responsabili di tali episodi sono risultati geneticamente differenti rispetto a quelli circolanti nei PVS, facendo supporre che questi casi siano ascrivibili a virus endemici sul territorio. In Italia il primo caso umano autoctono è stato segnato nel 1999 (Zanetti et al., 1999).
Il primo ceppo di HEV suino è stato identificato nel 1997 negli USA e si è rivelato geneticamente simile ai ceppi umani circolanti nello stesso territorio (Meng et al., 1997). Ceppi di HEV di origine suina sono stati identificati successivamente in numerosi Paesi e sono risultati, generalmente, geneticamente vicini ai ceppi di origine umana messi in evidenza negli stessi territori (Banks et al., 2004).
Nel suino, la stima della prevalenza è fortemente condizionata del tipo di campione esaminato (pool fecale o feci individuali, siero, bile, organi) e della composizione per età dei soggetti esaminati (de Deus et al., 2007). La prevalenza di capi infetti è di circa il 30%, mentre la proporzione di aziende infette può superare il 60%. Oltre che nei suini allevati, la circolazione di HEV è stata dimostrata anche in popolazioni di cinghiali o suini a vita libera (Martelli et al., 2008a, de Deus et al., 2008).
La presenza di ceppi di HEV molto simili a quelli di origine umana è stata dimostrata in almeno altre 4 specie di mammiferi (cervo, mangoste, cavalli, gatto domestico). I ceppi di origine aviare (responsabili della sindrome di epatomegalia-splenomegalia) hanno struttura genomica e sequenza nucleotidica simili a quelli dell'HEV umano, ma il genoma è più corto e l'identità nucleotidica è solo del 50% circa (Huang et al., 2004). Anticorpi anti-HEV sono stati evidenziati anche in numerose altre specie animali, quali topi, cani, bovini, ovicaprini, scimmie, cavie e bufali (Panda et al., 2007).
Si ritiene che nel suino la via principale di trasmissione sia quella oro-fecale, mentre non è stata dimostrata la trasmissione verticale. La forma replicativa del virus, oltre che nel fegato, si ritrova soprattutto nel tratto intestinale e nei linfonodi (Kasorndorkbua et al., 2003). La vire-

mia dura circa 2 settimane, mentre nelle feci è possibile rilevare HEV per un periodo medio di 3-4 settimane. La sieroconversione avviene 2-3 settimane post infezione. RNA di HEV è rilevabile principalmente in animali di 2-5 mesi d'età, mentre in genere soggetti sotto i 2 mesi e sopra i 6-8 mesi di vita sono negativi. In seguito a queste osservazioni e poiché si ritiene che l'immunità materna duri circa 2 mesi, si ipotizza che l'infezione naturale avvenga a circa 2-3 mesi d'età. L'infezione sarebbe quindi di breve durata, autoestinguendosi nel giro di poche settimane (Huang et al., 2002). Recentemente, il virus è stato tuttavia rinvenuto anche in animali prossimi all'età di macellazione, nei riproduttori e nel fegato di animali regolarmente macellati (de Deus et al., 2007). Non è chiaro se la presenza di HEV in soggetti adulti sia il risultato di un'infezione prolungata nel tempo, acquisita tardivamente, o di reinfezione. Nel suino, HEV provoca infezioni subcliniche con segni di epatite rilevabile solo a livello istologico. In alcuni casi è stata rilevata enterite linfoplasmocitaria e nefrite interstiziale multifocale linfoplasmocitaria (Meng et al., 1998). HEV, di per sé scarsamente patogeno, potrebbe però agire in sinergia con altri virus (es. PCV2 e PRRSV) (Martin et al., 2007).
L'ipotesi di una possibile trasmissione di tipo zoonotico dell'infezione nei Paesi industrializzati si basa sulle seguenti evidenze: a) i ceppi di HEV di origine suina appartenenti ai genotipi 3 e 4 sono molto simili geneticamente ai ceppi di HEV di origine umana circolanti nello stesso territorio (Banks et al., 2004); b) è stata dimostrata sperimentalmente la possibilità di infezione interspecifica di ceppi di HEV di origine umana al suino e di ceppi suini ai primati non umani (Meng et al., 1998, Kasorndorkbua et al., 2003; Arankalle et al., 2006); c) in Giappone, casi umani di epatite E sono stati messi in relazione diretta con consumo di carne cruda di cervo, carne di cinghiale alla griglia o bollita, fegato crudo di cinghiale; in molti di questi casi, sono stati evidenziati ceppi di HEV geneticamente identici nel paziente e nella carne o negli organi ancora conservati e ritenuti all'origine dell'infezione (Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003; Yazaki et al., 2003); d) persone professionalmente esposte al contatto con suini hanno valori di sieroprevalenza più elevati rispetto a gruppi di controllo (Hsieh et al., 1999; Drobeniuc et al., 2001; Meng et al., 2002; Withers et al., 2002; Siochu et al., 2004).
La conoscenza dell'epidemiologia di HEV negli allevamenti suinicoli e nelle popolazioni di cinghiale è una premessa indispensabile per valutare se, anche nel nostro Paese, esistono ragionevoli possibilità di trasmissione dell'infezione all'uomo e se, quindi, possano essere necessarie delle misure sanitarie per la tutela dei consumatori, degli addetti al settore e delle produzioni suinicole.Verranno presentati, in sintesi, i risultati del lavoro di ricerca che ha portato alla stesura della tesi di Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e controllo delle zoonosi (Martelli, 2008c).

MATERIALI E METODI

Prevalenza di HEV negli allevamenti del nord Italia

Nel periodo gennaio - giugno 2006 sono stati esaminati 6 allevamenti del nord Italia con lo scopo di stimare la prevalenza dell'infezione da HEV e di valutare alcuni aspetti epidemiologici dell'infezione (Di Bartolo et al 2008). Sono stati prelevati campioni fecali individuali da animali clinicamente sani delle seguenti categorie: magroni (3-4 mesi), suini grassi (8-9 mesi), scrofette nullipare, scrofe giovani (1-2 parti), scrofe anziane (più di 2 parti). Per ogni allevamento sono stati esaminati almeno 10 animali per categoria e sono state raccolte informazioni relative alla tipologia aziendale (ciclo chiuso o aperto) e alle dimensioni produttive.
La ricerca del genoma di HEV è stata eseguita utilizzando una tecnica di nested-RT-PCR (Erker et al., 1999) a partire dall'RNA virale estratto da una sospensione fecale. Per la carat-

terizzazione dei ceppi, sono stati sequenziati 16 campioni positivi scelti a caso tra quelli provenienti da 3 diverse aziende. I frammenti ottenuti sono stati allineati con quelli di origine suina, umana e di cinghiale presenti in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
La presenza di eventuali differenze in termini di rischio di infezione da HEV in funzione dello stadio produttivo e delle dimensioni aziendali, è stata valutata mediante un'analisi di regressione logistica. Centoquindici dei 274 suini testati (42%) sono risultati positivi per la ricerca del genoma di HEV. Tutte le 6 aziende esaminate sono risultate infette, con una prevalenza media variabile tra il 12,8% e il 72,5% (tab. 1). Suini positivi sono stati identificati in tutti gli stadi di produzione e in tutti i gruppi d'età esaminati. Nel settore di ingrasso, la prevalenza per HEV più elevata è stata riscontrata nei magroni (42,2%) mentre negli animali a fine ciclo produttivo la prevalenza era del 27%. Nel settore riproduzione, la prevalenza nelle scrofette era del 43,1%, nelle scrofe giovani del 38,6%, e nelle scrofe anziane del 53,4% (tab. 1). L'analisi di regressione logistica (tab. 2) ha evidenziato come le dimensioni aziendali costituiscano un importante fattore di rischio: le probabilità di infezione negli animali provenienti da allevamenti di grandi dimensioni (> 1000 capi) era infatti di circa 5 volte superiore rispetto ai soggetti allevati in aziende di dimensioni inferiori (OR=4,98; p=0,000). Per quanto riguarda l'età, le scrofe anziane presentavano un rischio di infezione (OR) di 2,54 volte superiore rispetto ai soggetti grassi; tale valore era prossimo alla significatività statistica (p=0,054). I ceppi identificati appartenevano al genotipo 3 e presentavano pecntuali di identità nucleotidica variabili tra il 79% e il 96,2% con i ceppi dello stesso genotipo presenti in Genbank. L'identità nucleotidica dei 16 ceppi esaminati variava dal 90,5 al 100%. In particolare, un gruppo di 7 ceppi italiani si collocava vicino ad un ceppo umano identificato in Olanda (identità 91,6 - 96,2%). Altri 9 ceppi suini italiani erano correlati (93,1%) sia ad un ceppo suino olandese sia ad un ceppo spagnolo identificato in campioni provenienti da scarichi fognari. Gli ultimi 2 ceppi si classificavano nel sottotipo f del genotipo 3.

Caratterizzazione molecolare di ceppi di HEV identificati in suini con differenti quadri patologici

L'indagine (Martelli et al., 2008b) è stata condotta su suini inviati a scopo diagnostico presso le sezioni di Brescia e Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER). In questo modo è stato possibile diversificare la provenienza degli animali esaminati e, contestualmente, valutare l'eventuale associazione tra la presenza di HEV e forme patologiche e/o altre infezioni intercorrenti. Sono stati esaminati 137 suini di 2-4 mesi di età, selezionati in modo casuale tra quelli inviati presso le 2 sezioni IZSLER. Gli animali provenivano da 45 allevamenti del nord Italia. Tutti i suini stati sottoposti a necroscopia e ad indagini di laboratorio (batteriologiche, virologiche, parassitologiche e sierologiche) variabili in funzione del sospetto diagnostico e/o del quadro anatomopatologico riscontrato. Gli esiti di queste indagini sono stati messi in relazione con l'eventuale infezione da HEV. Per ogni suino sono state inoltre raccolte informazioni relative a età (lattoni o magroni) e tipologia dell'allevamento di provenienza (ciclo aperto, chiuso, ingrasso, centro genetico). Le patologie riscontrate in sede autoptica sono state classificate, in base alla localizzazione preminente delle lesioni, in: patologie gastroenteriche, epatiche, polmonari o multiple (coinvolgimento di più di un organo/apparato). La ricerca del genoma di HEV è stata eseguita utilizzando 2 distinti protocolli di RT-nested-PCR (Erker et al., 1999; Huang et al., 2002) a partire dall'RNA virale estratto da un campione di bile prelevato da ciascun animale. Alcuni prodotti ottenuti in nested-RT-PCR, selezionati in maniera casuale, sono stati purificati e sequenziati allo scopo di confermare l'identità del prodotto ottenuto e con-

durre le analisi filogenetiche. La prevalenza per HEV è stata esaminata in funzione dell'età, tipologia di allevamento, presenza di lesioni anatomopatologiche macroscopiche, diagnosi dell'infezione da PRRSV o PCV2. Quarantuno dei 137 campioni analizzati (29,9%) sono risultati positivi per HEV con almeno uno dei 2 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 in funzione delle diverse tipologie di allevamento esaminate. Tuttavia, la prevalenza di HEV è risultata più elevata nei soggetti nei quali è stata evidenziata anche la presenza di PRRSV o PCV2 (26,7% nei PCV2 negativi contro il 38,9% nei PCV2 positivi; 28,9% nei PRRSV negativi contro il 38,9% nei PPRRSV positivi). I soggetti in magronaggio (età 80-120 giorni) presentavano una probabilità di infezione significativamente più elevata rispetto ai soggetti più giovani (OR=3,78; p=0,009), (tab. 3). Nei magroni, infatti, la prevalenza riscontrata era nettamente più elevata (46,9%) rispetto ai soggetti in svezzamento (20%). I ceppi identificati confrontati filogeneticamente 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'identità nucleotidica variabile dall'81,8% al 99,6%.

Presenza di HEV in una popolazione di cinghiali

La presenza di HEV è stata valutata nella popolazione di cinghiali del Parco Regionale dei Gessi Bolognesi (Martelli et al., 2008a). Da 88 animali clinicamente sani abbattuti nel periodo marzo - settembre 2006 è stato prelevato un campione di bile e sono stati raccolte informazioni relative a età, sesso, lunghezza del corpo e peso. La ricerca dell'RNA di HEV è stata condotta come precedentemente descritto per i campioni di origine suina. Dieci campioni positivi, provenienti da una frazione rappresentativa per età e sesso degli animali esaminati, sono stati sottoposti a sequenziamento ed analisi filogenetica. La prevalenza è stata valutata in funzione dell'età degli animali (giovani: <12 mesi; sub-adulti: 12-24 mesi; adulti: >24 mesi). Inoltre, per valutare il possibile effetto dell'infezione sulle caratteristiche biometriche degli animali, peso e lunghezza corporea dei cinghiali positivi per HEV sono stati comparati con quelli degli animali negativi della stessa età e sesso. Il genoma di HEV è stato identificato in 22 degli 88 animali testati (25%). Le caratteristiche biometriche degli animali infetti non differivano statisticamente da quelle degli animali non infetti della stessa classe d'età e dello stesso sesso.

L'analisi filogenetica ha evidenziato una completa identità nucleotidica nei 10 campioni positivi sequenziali. Il ceppo identificato apparteneva al genotipo 3, come altri ceppi indigeni isolati in Europa dall'uomo, suino e cinghiale. La percentuale di identità nucleotidica variabile dall'83,1% al 92,2% se paragonata con quella di ceppi messi in evidenza nell'uomo, nel suino e in scarichi fognari in Spagna, Olanda e Italia. La percentuale di identità con ceppi identificati nel cinghiale in Giappone variava tra il 66% e l'88%.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti inducono a ritenere che in Italia, come in altri Paesi a suinicoltura avanzata, l'infezione da HEV è estremamente diffusa sia in termini di allevamenti interessati (prevalenza di aziende infette) sia per quanto riguarda la proporzione di capi infetti (prevalenza individuale). Come per altre patologie infettive del suino, le dimensioni aziendali sembrano rappresentare un fattore di rischio importante probabilmente da mettere in relazione al maggior numero di soggetti recettivi presenti e al maggior turn-over di animali provenienti da altre aziende (Nakai et al., 2006).

All'interno degli allevamenti esaminati, la presenza di HEV è stata riscontrata in animali di tutte le categorie produttive, con un pattern di escrezione simile in tutte le aziende. Le prime indagini condotte in altri Paesi avevano evidenziato che HEV poteva essere identificato soprattutto in suini di 2-5 mesi d'età; gli animali più giovani erano generalmente negativi, probabilmente a causa dell'immunità passiva materna e anche negli animali oltre i 2-5 mesi di vita la prevalenza era generalmente bassa, probabilmente a causa di una siero conversione post-infezione e della successiva successiva eliminazione dell'infezione ad opera del sistema immunitario. Se da una parte i risultati da noi ottenuti concordano con le precedenti osservazioni relative alla maggiore probabilità di infezione in soggetti di 3-4 mesi d'età, dall'altra, la messa in evidenza della presenza di HEV anche in animali prossimi all'età di macellazione e nelle scrofe anziane appare in disaccordo con quanto rilevato da altri Autori. Recentemente, tuttavia, la presenza di HEV in animali adulti è stata osservata anche negli USA, Spagna, UK, Giappone e in Canada (Fernandez-Barredo et al., 2006; de Deus et al., 2007; McCreary et al., 2008) Sembrerebbe quindi che i suini possano essere recettivi a qualsiasi età; questa osservazione potrebbe essere spiegata con il fatto che la durata dell'infezione è in realtà più lunga di quanto inizialmente ipotizzato oppure con il fatto che l'immunità attiva non è proteggente verso nuove infezione o che i suini si possano re-infettare con ceppi differenti circolanti sullo stesso territorio, magari introdotti in allevamento con gli animali acquistati. Quest'ultima ipotesi, anche se in contrasto con il fatto che si ritiene che tutti i ceppi di HEV appartengano ad un unico sierotipo, potrebbe giustificare l'elevata prevalenza d'infezione riscontrata nelle scrofe anziane.
L'osservazione che i suini vivi e i cinghiali esaminati apparissero clinicamente sani e il fatto che non sia stata evidenziata una associazione tra la presenza di HEV e patologie microscopicamente evidenti, confermerebbe l'ipotesi che l'infezione da HEV evolva, nei suidi, in modo subclinico, senza apparenti ripercussioni di ordine sanitario e/o produttivo. Questo aspetto è di particolare rilievo in quanto animali infetti, ma clinicamente sani, vengono inviati al macello, inseriti nella filiera produttiva e rappresentano così una potenziale fonte di infezione per l'uomo.
Tuttavia, considerando che la prevalenza più elevata è stata osservata nei soggetti in cui oltre a HEV è stata messa in evidenza anche la presenza di PRRSV o PCV2, sarebbero necessarie ulteriori valutazioni del potenziale ruolo di HEV come fattore predisponente o condizionante l'insorgenza di sindromi ad eziologia multipla.
Per quanto riguarda la filogenesi e l'epidemiologia molecolare di HEV, i ceppi fino ad oggi evidenziati in Italia, sono tutti risultati appartenere al genotipo 3 a cui appartengono, attualmente, tutti i ceppi di HEV responsabili di infezione nel suino e dei casi umani autoctoni segnalati nei Paesi industrializzati (Lu et al., 2006). I ceppi messi in evidenza sono caratterizzati da elevati gradi di identità nucleotidica rispettivamente, tra loro e con altri ceppi di origine suina e umana evidenziati in Europa negli ultimi anni. Questa osservazione da un lato conferma la capacità dei ceppi di HEV di diversa origine di formare clusters geografici, e dall'altro rappresenta una conferma indiretta della possibilità di trasmissione di ceppi di HEV dal suino all'uomo. L'epidemiologia molecolare dei ceppi sequenziati nei diversi allevamenti ha inoltre evidenziato due differenti situazioni: in alcuni casi, ceppi provenienti da allevamenti diversi presentavano gradi di identità nucleotidica anche molto elevati (99,6%), facendo ipotizzare la circolazione di ceppi di HEV appartenenti ad un unico gruppo 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 identità nucleotidica dei ceppi provenienti da allevamenti di-

versi 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 diversi all'interno di un'unica azienda potrebbe essere invece la conseguenza dell'introduzione di suini di diversa origine, l'effetto della pressione selettiva esercitata sul virus da parte dell'immunità di popolazione, o la conseguenza di mutazioni spontanee.
Per quanto riguarda il cinghiale, è stata dimostrata la circolazione di HEV in popolazioni a vita libera e la presenza di virus anche in animali adulti e quindi prelevabili per scopi venatori. Contrariamente a quanto rilevato nel suino domestico, nel cinghiale le sequenze nucleotidiche da diversi individui positivi si sono rivelate identiche e l'analisi filogenetica ha mostrato come l'unico ceppo di cinghiale italiano ad oggi identificato sia più vicino a ceppi suini ed umani identificati in Europa, piuttosto che ai ceppi di cinghiale identificati in Giappone.
Benché la presenza e l'elevata prevalenza dell'infezione da HEV negli allevamenti e nei suini domestici e selvatici italiani sia stata ampiamente dimostrata, restano ancora da approfondire i potenziali pericoli per l'uomo. In particolare, i rischi per la salute umana sarebbero da ricondurre a due ambiti distinti: il contatto professionale con animali vivi o con le loro carcasse e l'esposizione al virus in ambito domestico. Relativamente al primo punto, i rischi riguarderebbero quelle categorie professionali (allevatori, personale addetto agli animali, macellatori e veterinari) che possono venire in contatto con i suini nel periodo di viremia e di escrezione fecale del virus. Per quanto riguarda il secondo punto, occorre prendere in considerazione la possibilità di infezione attraverso la manipolazione o il consumo di prodotti di origine suina. In particolare, un potenziale rischio è rappresentato dalla diffusione di nuove abitudini alimentari che prevedono il consumo di prodotti crudi di origine animale (es. sashimi, sushi, ecc.). Altra possibile fonte di infezione da HEV potrebbe essere rappresentata dalla contaminazione attraverso i reflui zootecnici delle acque potabili, di quelle usate per l'irrigazione di verdure e frutta o per l'allevamento di molluschi eduli.
L'ultima riflessione è quella relativa al potenziale impatto dell'infezione da HEV sul comparto suinicolo italiano. Se da una parte infatti non sono mai stati documentati nel suino episodi di malattia riconducibili all'infezione da HEV ed è ancora poco nota l'eventuale possibilità di copartecipazione di questo virus nel determinismo di sindromi ad eziologia multifattoriale, dall'altra occorre considerare alcuni scenari potenzialmente in grado di causare un danno diretto o indiretto all'economia del settore. E' infatti nota l'elevata capacità di mutazione dei virus ad RNA e, non potendosi escludere modificazioni genomiche in grado di causare un aumento di virulenza e di patogenicità, l'elevata prevalenza evidenziata pone gli allevamenti in una condizione di potenziale rischio. Da qui la necessità di meglio valutare, anche nel contesto italiano, l'epidemiologia dell'infezione e i fattori di rischio aziendali.
Altro argomento importante è quello relativo al potenziale zoonosico di HEV. Alla luce delle conoscenze fino ad oggi acquisite tale eventualità, sia pur provata, sembra relativamente remota e legata ad abitudini alimentari particolari o a condizioni igienico-sanitarie scadenti. Tuttavia, trattandosi di una zoonosi che coinvolge gli aspetti relativi alla sicurezza alimentare, la drammatica esperienza con la BSE e l'influenza aviare dovrebbe far riflettere sulla necessità di ottenere solide basi informative e decisionali non solo per realizzare la valutazione e la gestione del rischio, ma anche per consentirne una corretta comunicazione. Tutto ciò rispettando una logica di tutela delle produzioni e del consumatore.

Tabella 1. Prevalenza di HEV nelle feci in funzione della tipologia di allevamento e dell'età dei suini
Table 1. HEV Prevalence in faeces in relationship to herd typology and age of the animals

Tipologia aziendale	Allevamento n°	suini positivi/esaminati (%)										Prevalenza (%)	
		scrofette		scrofe giovani (1-2 parti)		scrofe anziane (> 2 parti)		magroni (< 120 giorni)		grassi (> 120 giorni)			
ciclo aperto	2	7/10	(70,0)	7/10	(70,0)	7/10	(70,0)	8/10	(80,0)	-	-	29/40	(72,5)
ciclo aperto	6	4/9	(44,4)	4/10	(40,0)	8/10	(80,0)	7/9	(77,8)	-	-	23/38	(60,5)
totale ciclo aperto		11/19	(57,9)	11/20	(55,0)	15/20	(75,0)	15/19	(78,9)	-	-	52/78	(66,7)
ciclo chiuso	1	3/10	(30,0)	5/10	(50,0)	9/10	(90,0)	1/10	(10,0)	6/10	(60,0)	24/50	(48,0)
ciclo chiuso	3	4/9	(44,4)	2/10	(20,0)	2/9	(22,2)	2/10	(20,0)	2/10	(20,0)	12/48	(25,0)
ciclo chiuso	4	2/10	(20,0)	2/10	(20,0)	1/10	(10,0)	1/7	(14,3)	0/10	(0,0)	6/47	(12,8)
ciclo chiuso	5	5/10	(50,0)	2/7	(28,6)	4/9	(44,4)	8/18	(44,4)	2/7	(28,6)	21/51	(41,2)
totale ciclo chiuso		14/39	(35,9)	11/37	(29,7)	16/38	(42,1)	12/45	(26,7)	10/37	(27,0)	63/196	(32,1)
tutti gli allevamenti		25/58	(43,1)	22/57	(38,6)	31/58	(53,4)	27/64	(42,2)	-	-	115/274	(42,0)

Tabella 2. Prevalenze e rischio di infezione in funzione dell'età dei suini, stadio produttivo e dimensioni aziendali
Table 2. Prevalence and risk of infection related to age of the animals, production stage and dimension of the herd

		positivi/esaminati	prevalenza (%)	Odds Ratio (OR)	IC al 95% per OR	P
stadio produttivo	scrofette (0 parti)	25/58	43,1	1,58	0,61-4,09	0,345
	scrofe giovani (1-2 parti)	22/57	38,6	1,33	0,51-3,47	0,559
	scrofe anziane (> 2 parti)	31/58	53,4	2,54	0,98-6,55	0,054
	magroni (90 - 120 giorni)	27/64	42,2	1,38	0,54-3,51	0,504
	grassi (> 120 giorni)	10/37	27,0	-	-	-
dimensioni aziendali	> 1000	97/179	54,2	4,98	2,73-9,09	0,000
(numero scrofe)	< 1000	18/95	18,9	-	-	-

Tabella 3. Prevalenze e rischio di infezione in base all'età dei suini, tipo di patologia evidenziata in sede autoptica e tipologia aziendale

Table 3. Prevalences and risk of infection related to age of the animals, pathological conditions detected during necropsy and herd typology

		Positivi/ esaminati	Prevalenza (%)	Odds ratio (OR)	IC al 95% per OR	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	positivo	14/36	38,9	1,02	0,36-2,92	0,966
	negativo	27/101	26,7	-	-	-
PRRSV	positivo	17/54	31,5	0,53	0,20-1,41	0,203
	negativo	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

Bibliografia

Arankalle V.A., Chobe L.P., Chadha M.S. (2006). Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. J Viral Hepat 13, 742-745.

Banks M., Bendall R., Grierson S., Heath G., Mitchell J., Dalton H. (2004). Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. Emerg Infect Dis 10, 953-955.

de Deus N., Peralta B., Pina S., Allepuz A., Mateu E., Vidal D., Ruiz-Fons F., Martin M., Gortazar C., Segales J. (2008). Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. Vet Microbiol 129, 163-170.

de Deus N., Seminati C., Pina S., Mateu E., Martin M., Segales J. (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, 105-114.

Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2008). Widespread diffusion of Genotype 3 Hepatitis E Virus among farming swine in Northern Italy. Vet Microbiol 132, 47–55.

Drobeniuc J., Favorov M.O., Shapiro C.N., Bell B.P., Mast E.E., Dadu A., Culver D., Iaro voi P., Robertson B.H., Margolis H.S. (2001). Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. J Infect Dis 184, 1594-1597.

Erker J.C., Desai S.M., Mushahwar I.K. (1999). Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide pri mers. J Virol Methods 81, 109-113.

Fernandez-Barredo S., Galiana C., Garcia A., Vega S., Gomez M.T., Perez-Gracia M.T. (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, 462-465.

Hsieh S.Y., Meng X.J., Wu Y.H., Liu S.T., Tam A.W., Lin D.Y., Liaw Y.F. (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, 3828-3834.

Huang F.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J. (2002). Detection by reverse transcription-PCR and genetic cha racterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. J Clin Microbiol 40, 1326-1332.

Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H., Shivaprasad H.L., Pierson F.W., Toth T.E., Meng X.J. (2004). Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. J Gen Virol 85, 1609-1618.

Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng. X.J. (2003). Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. Can J Vet Res 67, 303-306.

Lu L., Li C., Hagedorn C.H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol 16, 5-36.

Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Delogu M., Ostanello F. (2008a). Detection of Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. Vet Microbiol 126, 74-81.

Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Inglese N., Caprioli A., Ruggeri F.M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F. (2008b). Epidemiologia e caratterizzazione molecolare di ceppi di virus

dell'epatite E (HEV) identificati in suini italiani con differenti quadri patologici. Atti 34° Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, 257-266
Martelli F. (2008c). L'epatite E nei suidi: epidemiologia, diagnosi e filogenesi. Tesi di Dottorato di Ricerca in Epidemiologia e controllo delle Zoonosi.
Martin M., Segales J., Huang F.F., Guenette D.K., Mateu E., de Deus N., Meng X.J. (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., Okada K., Takahashi K., Mishiro S. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. J Infect Dis 188, 944.
McCreary C., Martelli F., Grierson S., Ostanello F., Nevel A., Banks M. (2008). Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. Vet Rec 163, 261-265.
Meng X.J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D.K., Toth T.E., Engle R.E., Emerson S.U., Purcell R.H. (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, 117-122.
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 72, 9714-9721.
Meng, X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA 94, 9860-9865.
Nakai I., Kato K., Miyazaki A., Yoshii M., Li T.C., Takeda N., Tsunemitsu H., Ikeda H. (2006). Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms, Am J Trop Med Hyg 75, 1171–1177.
Okamoto H. (2008). Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. Virus Res 127, 216-218.
Panda S.K., Thakral D., Rehman S. (2007). Hepatitis E virus. Rev Med Virol 17, 151-180.
Siochu, Froesner, Tassis, Kyriakis, Alexopulos, 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 congress 1, 367.
Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet 362, 371-373.
Withers M.R., Correa M.T., Morrow M., Stebbins M.E., Seriwatana J., Webster W.D., Boak M.B., Vaughn D.W. (2002). Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. Am J Trop Med Hyg 66, 384-388.
Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y., Okamoto H. (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, 2351-2357.
Zanetti A.R., Schlauder G.G., Romanò L., Tanzi E., Fabris P., Dawson G.J., Mushahwar I.K. (1999). Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. J Med Virol 57, 356-360.

LE PREMISCELE MEDICATE DI NUOVA GENERAZIONE

Le premiscele medicate microincapsulate TREI sono realizzate con una tecnologia farmaceutica brevettata* capace di garantire la stabilità nei mangimi e massimizzare la biodisponibilità dei principi attivi destinati alla medicazione degli alimenti per suini.

La tecnica di microincapsulazione con matrici di lipogel garantisce **protezione fisica** contrastando i fattori di degradazione che compromettono la stabilità dei principi attivi nel mangime e assicura **protezione gastrica** con significativo incremento dell'assorbimento enterico.

Le premiscele medicate microincapsulate TREI amplificano l'efficacia degli interventi terapeutici e dei programmi di medicazione strategica ottimizzando l'attività in vivo dei medicamenti.

*Dry protection system:
brevettata in Europa e negli Stati Uniti

TREI

INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI S.P.A
MODENA - ITALY - Via Pietro Bembo,12 - Tel. 059 826 697 ra - Fax 059 335 073
Stabilimento di produzione: Rio Saliceto (RE) Via Affarosa, 4 Tel. 0522 640 711 ra - Fax 0522 649 757
www.treivet.com • e-mail info@treivet.com