Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS nel 2010 si svolgono grazie al contributo di:

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

In collaborazione con:

VENETASSICURA

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI 2010

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2010

XXXVI MEETING ANNUALE

Montichiari (BS)

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2010

Atti dellla SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini
XXXVI Meeting Annuale, Montichiari (BS), 25-26 Marzo 2010.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2010.

ISBN 978-88-903311-2-1

INDICE

Prefazione ..... pag. 13

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Reggio Emilia, 18 aprile 2009

NUOVI INGREDIENTI NEI MANGIMI PER SUINI

Peisker M. Ingredienti per mangimi derivati da processi industriali di produzione di biocarburanti ..... pag. 16

Baricco G. Utilizzo alimentare nel suino dei coprodotti dell'industria dei biocarburanti ..... pag. 21

Corino C. Visione moderna della nutrizione lipidica del suino ..... pag. 33

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO
Salsomaggiore Terme (PR), 9 ottobre 2009

MICOTOSSINE E MICOTOSSICOSI

Conte F., Baricco G. - Approccio pratico alla gestione delle micotossine nell'alimentazione del suino ..... pag. 52

Ballarini G. Contaminazione da micotossine e catena alimentare ..... pag. 69

ATTI DEL XXXVI MEETING ANNUALE
Montichiari (BS), 25-26 marzo 2010

TAVOLA ROTONDA:
INFLUENZA A/H1N1: STATO DELL' ARTE

Van Reeth K., Van Poucke S., De Vleeschauwer A. - I suini e l'influenza pandemica: miti contro fatti ..... pag. 82

TAVOLA ROTONDA:
EFFETTO DEI CAMBIAMENTI CLIMATICI SULLA DIFFUSIONE DELLE MALATTIE

Cacciamani C. Cambiamenti climatici: fatti vs speculazioni ..... pag. 92

Bertollini R. Cambiamenti climatici e malattie infettive dell'uomo ..... pag. 99

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Pastorelli G., Corino C., Rossi R., Faustini M. - Attività antiradicalica totale nel sangue: determinazione dei valori di riferimento nelle scrofette ..... pag. 102

Zappulla D., Rota Nodari S., Nassuato C., Vinco L.J., Candotti P. Utilizzo della carta quale materiale per la nidificazione nella scrofa: valutazione di alcuni parametri zootecnici, comportamentali e del cortisolo salivare ..... pag. 108

Candotti P., Merialdi G., Guerra O., Nassuato C., Rota Nodari S. Effetto della somministrazione di antibiotici sulla flora batterica fecale in suinetti svezzati affetti da sindrome di deperimento ..... pag. 121

Magistrali C.F., Cucco L., D'Avino N., Paniccia' M., Neri MC., Pezzotti G. - Sensibilita' agli antimicrobici di isolati di *Brachyspira Hyodysenteriae e Brachyspira Pilosicoli* da casi di enterite del magronaggio-ingrasso in allevamenti italiani ..... pag. 130

Raffi V., Mazzoni C., Rosignoli C., Bonilauri P., Spaggiari B., Gelmetti D., Gibelli L., Maioli G., Faccini S., Dottori M., Luppi A., Tonon F. - Clostridiosi in sala parto: descrizione di un caso clinico dall'insorgenza atipica ..... pag. 136

Zanoni MG, Gradassi M., Moreno Martin A., Catelli A., Salogni C., Sozzi E., Foni E., Cordioli P., Alborali L. - Descrizione di un episodio di influenza da virus pandemico (A/H1N1) in un allevamento suino del Nord Italia ..... pag. 145

Sozzi E., Martinelli N., Moreno A., Lelli D., Fontana R., Canelli E., Vinco L.J., Alborali G.L., Lombardi G., Cordioli P. - Virus influenzale pandemico (A/H1N1) nel suino ..... pag. 153

Foni E., Chiapponi C., Sozzi E., Barbieri I., Moreno A.M., Merenda M., Luppi A., Alborali L., Cordioli P. - Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia ..... pag. 159

Pozzi P.S., Ozari R., Hadani Y., David D., Yadin H., Dikie S., Bashara R., King R., Perl S. - Descrizione di un focolaio di peste suina classica in un allevamento a ciclo chiuso ..... pag. 167

Vitale N., Pitti M., Viara S., Origlia S., Rosso F., Chiavacci L., Masoero L., Sona B. - Persistenza del virus della malattia di Aujesky in allevamento: analisi dei fattori di rischio ..... pag. 177

Grattarola C., Bellino C., Botta E., Dondo A., Maggi E., Massa M., Mondino S., Tursi M., Varnava' D., Cagnasso A. - Indagine in campo sulla diffusione della cistite della scrofa ..... pag. 183

Apicella M., Osella E., Gambino F., Alborali L., Zanoni M.G., Salogni C., Bollo E., Guarda F. - Contributo allo studio delle cistiti subcliniche nelle scrofette al macello ..... pag. 193

Gusmara C., Invernizzi F., Andreoni S., Teli L., Mazzotti A., Sala V. Osservazioni diagnostiche sulle infezioni urinarie (uti) della scrofa ..... pag. 198

Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici ..... pag. 205

Iodice G., Luppi A., Franchi L., Bonilauri P., Merenda M., Dottori M. Infezione contemporanea da sierotipi 4 e 12 di *Haemophilus parasuis* in un allevamento suino ..... pag. 212

Sensi M., Catalano A., Salvatori-Franchi F., Tinaro M., Panzieri C., Marchi S., Mariotti C., Pecorelli I., Orsini S., Costarelli S. - Idiopathic Vesicular Disease (IVD): segnalazione di un caso in Umbria ..... pag. 221

Gradassi M., Pavesi R., Boniotti B., Nassuato C., Giovannini S., Giacomini E., Bellini S., Pacciarini M., Alborali L. - PRRSV in campioni di fluido orale: studio longitudinale in condizioni di campo ..... pag. 225

Dotti S., Sandri G.P., Villa R., Razzuoli E., Sossi E., Amadori M. Dinamica temporale della risposta immunitaria verso il virus della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) in scrofette ..... pag. 232

Bresaola M., Lombardo T., Villa R., Sossi E., Ferrari M. - Studio retrospettivo sulla prevalenza di *Swine Torque Teno Virus* genogruppi 1 e 2 e coinfezione con *Porcine Circovirus type 2* in sieri di suini allevati in Italia (dal 1990 al 2009) ..... pag. 239

Candotti P., Nassuato C., Rota Nodari S. - Livelli di lipopolisaccaridi sierici superiori in suini colpiti da forme di dimagrimento e deperimento nel settore svezzamento ..... pag. 248

Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Govoni N., Dottori M.[1], Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. - Scrofe convenzionali fecondate con seme artificialmente infettato con Circovirus suino tipo2 (PCV2) ..... pag. 254

Canelli E., Catella A., Alborali L., Sozzi E., Lelli D., Moreno A., Fontana R., Cordioli P. - Studio preliminare sulla variabilità genetica dei ceppi di PCV2 isolati tra il 1999 e il 2002 e dal 2007 ad oggi ..... pag. 265

Amedeo S., Capucchio M.T., Apicella M., Guarda F., Mioletti S. Risultati preliminari sull'analisi dei glicosamminoglicani in testicoli sani e criptorchidi di suino ..... pag. 271

Borghetti P., Ferrari L., De Angelis E., Morganti M., Caleffi A., Gozio S., Guazzetti S., Martelli P. - Risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata dopo vaccinazione singola verso PCV2 in suini successivamente esposti ad infezione spontanea ..... pag. 276

Bortoletto G., Martini M., Nardelli S., Drigo M. - Monitoraggio sierologico, virologico e produttivo per il controllo dell'infezione da PRRSV in un allevamento da riproduzione endemicamente infetto ..... pag. 286

Botta E., Dimarcoberardino F., Massa M., Mihoc M., Rigano R., Russo Frattasi M. - Segnalazione di un caso di polimelia in un suinetto ..... pag. 295

Bousquet E., Rousseau C., Segot C., Guicherd A., Goutalier J., Montanari L. - Demiscelazione per elutriazione di differenti premiscele medicate a base di amoxicillina ..... pag. 299

Bousquet E., Cano G., Guicherd A., Goutalier J., Montanari L. - Stabilita' nel mangime pellettato di differenti premiscele medicate a base di amoxicillina ..... pag. 303

Bousquet E., Cano G., Guicherd A., Goutalier J., Montanari L. - Stabilita' nel mangime sfarinato di differenti premiscele medicate a base di amoxicillina ..... pag. 306

Cocumelli C., Perrone V., Falchi A., Cito G. - Caso di rabdomioma come reperto di macellazione ..... pag. 309

Di Martino G., Bonfanti L., Capello K., Patregnani T., Stefani A., Schiavon E., Gottardo F. - Effetti della presenza della coda durante la fase di svezzamento nello sviluppo di lesioni in suinetti maschi e femmine ..... pag. 313

Ferro P., Mandelli C., De Paz X. - Utilizzo di Tilmicosina (Pulmotil™) nel mangime Prestarter: esperienze pratiche ..... pag. 323

Giuliotti L., Salvadori G., Benvenuti M.N., Russo C., Ventura A., Gatta D. - Impiego di fonti proteiche alternative alla soia nell'alimentazione del suino pesante ..... pag. 329

Magistrali C.F., Cucco L., D'Avino N., D'Angelo G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Valutazione della sensibilita' ad antimicrobici di *B.hyodysenteriae*: confronto tra due metodi ..... pag. 337

Marruchella G., Giacominelli-Stuffler R., Maccarrone M. Gli eicosanoidi nelle pneumopatie infiammatorie del suino ..... pag. 341

Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Scollo A., Bonilauri P. Analisi dei ritorni nella scrofa: studi preliminari ..... pag. 347

Perrone V., Marruchella G., Cito G. - Lesioni podali e benessere animale – indagini preliminari in suini regolarmente macellati ..... pag. 357

Razzuoli E., Cafazzo S., Magnani D., Cala' P., Dotti S., Archetti IL., Nanni Costa L., Amadori M. - Valutazioni preliminari degli effetti del lungo trasporto sulla risposta immunitaria innata del suinetto ..... pag. 360

Sala V., Gusmara C., Brignoli P., Cabrini L., Musella C. Bioattivazione e qualità ambientale nell'allevamento del suino. Consuntivo di tre anni d'attività ..... pag. 368

Schwarzer K., Maffezzoli D. - Effetto di un prodotto multi-funzionale sulle performance di suinetti alimentati con un mangime contaminato naturalmente da micotossine ..... pag. 375

Scollo A., Tonon F., Rossetto G., Stelletta C., Mazzoni C., Borri E., Raffi V. - Effetti della somministrazione di ergometrina nelle fasi iniziali del parto in scrofe con differente condizione corporea ..... pag. 383

Spada F., Baricco G. - Ulcera gastrica del suino e macinazione dei mangimi: un caso clinico. ..... pag. 389

Terreni M., Vischi O., Martelli P. - Analisi di indicatori di efficacia della vaccinazione verso PCV2 nei suinetti. ..... pag. 393

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2010

Arioli E., Caleffi A., Luppi A., Bonilauri P., Maioli G., Dottori M., Marco E. **-** Programma di eradicazione di *Actinobacillus pleuropneumoniae* in un allevamento suino ..... pag. 402

Affidati a Intervet/Schering-Plough Animal Health.
Previeni la pleuropolmonite suina con un vaccino innovativo ad azione mirata.
E chiedi al tuo Medico Veterinario di fiducia informazioni sul nuovo metodo di valutazione della pleurite al macello.

* Merialdi G. et al. (2008): Atti XXXIV Meeting annuale SIPAS: 319-325.

www.intervet.it

Intervet
Schering-Plough Animal Health

PREFAZIONE

Nell'accingermi ad assolvere al gradito compito di stilare e firmare questa presentazione non posso esimermi dall'esprimere la soddisfazione mia personale e del Consiglio Direttivo tutto nel vedere realizzato questo volume, espressione tangibile dell'impegno profuso dagli artefici provenienti non solo dall'ambito della ricerca ma anche da quella nutrita schiera di medici veterinari che, pur esprimendo competenze anche diversificate, ogni giorno si dedica con professionalità ai molteplici aspetti della suinicoltura. Anche questo volume, accanto alla pubblicazione delle relazioni presentate nel corso delle Giornate di Studio organizzate nel 2009 e del Meeting che si sta svolgendo a Montichiari, si caratterizza per un interesse costante negli anni alla presentazione delle comunicazioni scientifiche da parte dei Soci, segno inequivocabile ed ormai consolidato della vivacità culturale e del fervore di una attività di ricerca, non solo prerogativa di coloro che si dedicano a tempo pieno a questi aspetti, ma anche da parte dei colleghi che, nell'esercizio dell'attività professionale, traggono spunto per segnalare esperienze e condividerne il risultato con una matura disponibilità al confronto e alla discussione. Proprio dal confronto sereno e dalla discussione aperta delle esperienze diversamente maturate si genera il germe dal quale continua a crescere il frutto più autentico di una società scientifica, lo sviluppo della conoscenza.

È pertanto motivo di particolare soddisfazione constatare che negli anni, pur assistendo ad un cambiamento radicale e continuo delle modalità di comunicazione e di acquisizione delle conoscenze, una Società scientifica, nel caso di specie la SIPAS, mantiene un ruolo plintale in quello che gli Autori anglosassoni definiscono "knowledge translation and transfer", la traduzione delle conoscenze e loro trasferimento, attraverso l'attivazione di scambio delle conoscenze, disseminazione dei risultati della ricerca, accelerazione del processo di trasferimento nell'attività pratica. Questo trasferimento di conoscenze finalizzato all'innovazione viene richiesto con sempre maggiore intensità anche in relazione alla velocità con cui tutto ciò che ci circonda, oggi sempre più, si muove e si evolve. Affinché ciò si realizzi con effetti virtuosi sul settore di riferimento è necessario il collegamento costante tra fruitori della conoscenze che provvederanno al trasferimento e al conseguente auspicabile miglioramento del settore e coloro che devono provvedere a individuare nuove conoscenze con finalità innovative. Questo flusso di conoscenze che dalla ricerca fluisce nella pratica e di esigenze che, nella direzione opposta, alimentano la richiesta di nuove conoscenze è il primo elemento che muove la continua generazione del progresso che potrà definirsi tale solo se "il nuovo" sarà veramente tale e presenterà caratteri di spiccata innovatività. Non di rado si assiste a situazioni in cui conoscenze già da tempo acquisite e talvolta superate o dimenticate vengono ri-proposte come elementi innovativi solo perché trasportate da una fresca brezza che, in realtà, non è altro che l'alito di quella presunzione propria dell'ignoranza. Una Società scientifica oggi, almeno per chi scrive, ha principalmente il ruolo di rappresentare un momento in cui si realizza la traduzione delle conoscenze ed il trasferimento delle stesse, rappresentando la ragione principale del suo "continuare ad esistere" a dispetto delle molteplici e sempre più crescenti occasioni di acquisizione delle informazioni attraverso le più diverse e numericamente crescenti vie.

Mi sia consentito tracciare un bilancio di "un ciclo" che in questo giorno viene a completarsi, un triennio che ha visto impegnato il Consiglio Direttivo che ho avuto l'onore di presiedere nella realizzazione degli scopi statutari che non si discostano da quanto sopra esposto.

Il completamento di questo percorso si concreta con la realizzazione di questo volume che propone argomenti di pressante attualità quali l'influenza "pandemica" e il ruolo dei cambiamenti climatici sull'evoluzione delle malattie dell'uomo e degli animali. Due argomenti di elevata valenza culturale che superano ampiamente l'ambito della suinicoltura e che si estendono sino alle problematiche della salute delle altre specie con particolare riferimento a quella umana. La scelta degli argomenti da affrontare nelle tavole rotonde del Meeting Annuale 2010 è avvenuta nell'ottica di "knowledge translation and transfer".

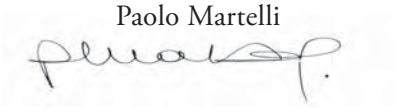
L'occasione è opportuna per esprimere un sincero ringraziamento alle Industrie Salute Animale che, grazie alla fiducia accordata, hanno reso possibile la realizzazione più compiuta delle iniziative promosse contribuendo a far progredire costantemente la nostra Società nel perseguimento degli obiettivi statutari.

Un ringraziamento particolare ai colleghi del Consiglio Direttivo che con spirito di servizio e costante impegno sono stati artefici dei successi conseguiti e alla Segreteria Delegata per la professionalità dimostrata e per l'aperta ed amichevole disponibilità. A tutti i Relatori vada il plauso sincero per la competenza dimostrata.

Ai lettori, con l'augurio di una proficua lettura, giungano il mio personale ringraziamento per l'attenzione che hanno dedicato alle manifestazioni della Società e l'invito a mantenere alto l'interesse verso la SIPAS, certo che saprà essere sempre più all'altezza delle esigenze di quella realtà produttiva da cui trarrà spunti per la dissertazione scientifica senza penalizzare l'aggiornamento con finalità applicative.

Parma, 25 marzo 2010

Il Presidente
Paolo Martelli



ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SIPAS

NUOVI INGREDIENTI NEI MANGIMI PER SUINI

Reggio Emilia 18 aprile 2009

INGREDIENTI PER MANGIMI DERIVATI DA PROCESSI INDUSTRIALI DI PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI

DR. MANFRED PEISKER

ADM Specialty Ingredients (Europe) B.V. Stationsstraat 76, 1541 LJ - Koog aan de Zaan, Paesi Bassi

INTRODUZIONE

L'avvento dell'industria dei biocarburanti ha avuto un enorme impatto sul settore agricolo (agricoltura e allevamento), su quello agroalimentare e dei mangimi. Ingredienti come mais, grano e semi per oli vegetali sono stati riconvertiti per la produzione di etanolo e biodiesel: la produzione di biogas ha un'appetibilità economica maggiore della produzione del latte. Negli ultimi anni la svolta globale verso i biocarburanti ha causato un aumento considerevole della richiesta di resa energetica dei mangimi. Di conseguenza, la resa energetica è diventata relativamente più cara e le proteine relativamente più economiche.

Tuttavia il settore dei biocarburanti ci restituisce degli ingredienti non certo di nuova introduzione, quali il glicerolo, i solidi e solubili di distilleria e la farina di colza. Le proporzioni del fenomeno, tuttavia, hanno assunto una dimensione senza precedenti. L'utilizzo ottimale di questi ingredienti come parte integrante della dieta animale risulta complesso, alla luce del fatto che il contenuto e la disponibilità degli aminoacidi chiave - quali la lisina e la treonina - siano inesistenti o bassi e vi siano variazioni nella fibra grezza. Le diete contenenti tali ingredienti devono essere bilanciate in termini totali di aminoacidi digeribili ed energia metabolizzabile.

Fino al decennio in corso l'etanolo derivato dallo zucchero prodotto in Brasile dominava l'intero settore dei biocombustibili. Tuttavia, la recente espansione produzione statunitense di dell'etanolo derivato dal mais ha superato notevolmente il concorrente brasiliano. Nel 2008/09 il 30% del raccolto di mais negli Stati Uniti è stato destinato alla produzione di etanolo; l'impatto sull'industria alimentare mondiale è stato impressionante. Il prezzo del mais ha raggiunto livelli record prima di ridiscendere sulla scorta dei prezzi in ribasso del petrolio.

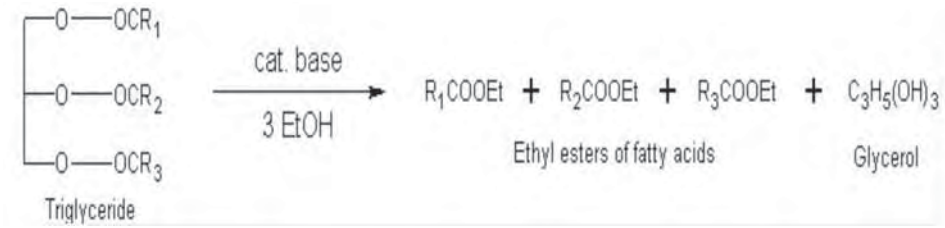
Appena un anno fa la produzione di biocarburanti è cresciuta esponenzialmente sia negli Stati Uniti sia in Europa. In Asia vaste aree sono state piantumate a palma da olio per la trasformazione del biodiesel. Oggi i biocarburanti stanno subendo una frenata in seguito al calo del prezzo del greggio, alle esigenze ambientali e alla crisi economica globale.

In aggiunta alle problematiche economiche attuali, i talloni d'Achille dei biocarburanti sono il legame con il prezzo globale del greggio e la dipendenza dai sussidi governativi. L'anno scorso, quando il prezzo del petrolio è caduto del 75%, moltissime attività sono crollate. Ciò nonostante, la probabile risalita del greggio a prezzi elevati e l'intenzione politica di continuare a fornire sussidi al settore fanno sì che la produzione di biocarburanti possa continuare.

GLICEROLO

Il glicerolo è principalmente estratto da oli e grassi vegetali. Nel processo produttivo del biodiesel, in presenza di un catalizzatore, il triacilglicerolo nell'olio vegetale reagisce con il metanolo o l'etanolo e produce metil-estere di acidi grassi (biodiesel) e glicerolo.

La reazione è la seguente:



La reazione viene accelerata da un catalizzatore. I catalizzatori basici più comunemente utilizzati sono NaOH o KOH.

Se si utilizza NaOH come catalizzatore, il glicerolo per mangimi (80%) può contenere il 2-3% di Na (principalmente sotto forma di NaCl). Se si utilizza KOH, invece, il glicerolo per mangimi prodotto può contenere il 2-3% di K. Il contenuto di sali del glicerolo (ad esempio NaCl o KCl) deve essere tenuto in considerazione nella formulazione del mangime animale. Il glicerolo grezzo può essere raffinato completamente (99,7% di purezza) o parzialmente (> 80 % di purezza). Il glicerolo parzialmente raffinato viene utilizzato principalmente nel settore dei mangimi animali.

Il glicerolo vanta oltre 1500 applicazioni in un gran numero di settori tra cui la cosmesi, l'industria farmaceutica, alimentare, dei mangimi e altre. Il glicerolo puro è un liquido incolore e inodore, mentre il glicerolo per mangimi (>80%) è un liquido giallastro dal gusto dolce o salato. Apparentemente il gusto dolce aumenta l'appetibilità del mangime animale. Il punto di congelamento dipende alla purezza del glicerolo. Il glicerolo per mangimi (80% di contenuto minimo di glicerolo) ha un punto di congelamento pari a –20°C. Il glicerolo grezzo è un liquido leggermente viscoso, igroscopico e immediatamente solubile in soluzione acquosa. La viscosità a 20°C del glicerolo per mangimi è pari a 150 mPas, inferiore alla melassa e assimilabile all'olio vegetale.

IL GLICEROLO NEL MANGIME DEI SUINI

Il glicerolo rappresenta una buona fonte di energia nei mangimi per animali da allevamento. In seguito all'aumento del prezzo dei cereali, l'uso del glicerolo come fonte energetica nei mangimi animali è diventato più appetibile. Inoltre, l'integrazione del glicerolo nella dieta può migliorare la qualità del pellet e della carne.

Valore energetico

Il glicerolo è assorbito rapidamente dopo l'ingestione e, una volta completata la fase di assimilazione, se ne trovano tracce solamente nelle feci (Kijora, 2007). Di conseguenza la digeribilità del glicerolo è di circa il 100%. L'energia lorda del glicerolo puro è 18,1 MJ/kg e grazie all'assimilazione pressoché completa, l'energia digeribile può essere stimata agli stessi livelli dell'energia lorda. Lammers et al. (2007) hanno calcolato livelli pari al 99% per i suinetti.

Nei suini e nel pollame l'energia metabolizzabile (ME) è legata ai livelli di integrazione di glicerolo. Bartelt and Schneider (2002) hanno determinato i valori ME di glicerolo nei suini

e nel pollame attraverso uno studio differenziale, con valori pari a 0, 5, 10 e 15% di glicerolo come sostituto dell'amido di mais. L'escrezione di glicerolo nell'urina aumenta se la dieta comprende oltre il 5% di glicerolo. I valori ME più elevati sono stati riscontrati a livelli di integrazione di glicerolo pari al 5%. Con l'aumento dell'integrazione del glicerolo, l'ME si riduce, specialmente nei suini (Tabella 1). Sulla base del valore energetico determinato dallo studio in esame, gli autori hanno suggerito una concentrazione di glicerolo puro nella formulazione della dieta non superiore al 5% (vale a dire 6-7% di glicerolo per mangimi) al fine di sfruttare al massimo il valore energetico del glicerolo.

Tabella 1: ME di glicerolo per galline, polli d'allevamento e suini

Glicerolo %	*Galline*	*Polli d'allevamento*	*Suini-misurata**	*Suini-calcolata***
5	17,6	17,7	17,5	17,58
10	16,8	17,0	14,4	14,27
15	14,5	15,4	10,6	11,06

* Valori determinati con studio differenziale (Bartelt and Schneider, 2002)

** Valori calcolati come: ME = GE di glicerolo ingerito – GE di glicerolo nell'urina dei suini (Kijora,2007)

Nei suini l'energia metabolizzabile (ME) può essere calcolata misurando il glicerolo presente nelle urine, sottraendo l'energia lorda (GE) del glicerolo nelle urine alla GE totale del regime dietetico (Tabella 2). A bassi livelli di integrazione del glicerolo (≤ 5% puro), l'efficienza dell'utilizzo energetico nei suini è ~97%.

Suinetti

Lammers et al. (2007) hanno valutato l'uso del glicerolo per mangimi come fonte di energia per suini da latte (7,9 kg). I suini sono stati alimentati con una dieta a base di mais e soia contenente tre livelli di glicerolo per mangimi allo zero, 5 e 10% per un periodo di test di 33 giorni. I dati relativi alle performance non sono variati con l'integrazione del glicerolo (Tabella 3).

Tabella 3: effetto del glicerolo grezzo sulla crescita dei suinetti *(Lammers et al., 2007)*

	% di glicerolo nella dieta						
	0		5		10		
	LS medio	SE	LS medio	SE	LS medio	SE	P
Recinto – aumento di peso (kg)	60,9	1,4	61,2	1,4	60,2	1,4	0,9
Recinto - mangime: aumento (kg/kg)	1,6	0,02	1,6	0,02	1,6	0,02	0,09
Aumento medio giornaliero (kg/d)	0,46	0,01	0,46	0,01	0,45	0,01	>0,1

Suini in fase di crescita/adulti

Già negli anni Novanta Kijora ha svolto studi di alimentazione su suini in fase di crescita e adulti con livelli di integrazione di glicerolo nella dieta fino al 30%. La crescita ottimale si osservava a livelli di integrazione di glicerolo tra il 5 e il 10%. Si è osservato che con alte quantità di glicerolo nella dieta, l'apporto idrico adeguato diventa particolarmente importante, in quanto il glicerolo può influire sull'osmoregolazione. L'integrazione del glicerolo nella dieta, grazie al suo sapore dolce, ha generato un aumento nell'ingestione del mangime.

Qualità della carne

Diversi studi hanno dimostrato che l'aggiunta del 5% di glicerolo nel mangime destinato a suini da ingrasso ha un effetto positivo sulla qualità della carne (Mourot et al, 1993; Cerneau et al., 1994). L'aggiunta del 5% di glicerolo alla dieta ha aumentato notevolmente la ritenzione idrica nei tessuti e ha ridotto significativamente le perdite dovute al gocciolamento o alla cottura, con risultante aumento della resa di cottura (Mourot et al., 1993; Cerneau et al., 1994)**.**

Qualità del pellet

L'aggiunta di glicerolo ha un impatto sui parametri fisici, chimici e igienici dei mangimi. L'aggiunta di glicerolo non ha fatto registrare aumenti nel contenuto di ergosterolo, indicatore dell'attività fungina (Suedekum 2006). La spiegazione è data dalla ridotta attività dell'acqua libera (valori aW); di conseguenza il glicerolo può migliorare la durata di conservazione del mangime. Löwe (2000) ha riportato che i livelli di inclusione di glicerolo fino al 12% generano un effetto positivo sulla qualità del pellet, come indica la prolungata conservazione dello stesso, la minor percentuale di polverizzazione (Pfost-Test) e la riduzione del consumo di energia elettrica alla pressa pellet del 20 - 30%. Il glicerolo può sostituire gli agglomeranti attualmente in commercio per i mangimi in pellet.

Utilizzo del glicerolo in allevamento

Il glicerolo può essere utilizzato direttamente in allevamento, preferibilmente con sistemi di somministrazione liquida e miscelatura sul posto. Richiede una vasca di raccolta separata per il glicerolo, una bilancia o una pompa di misurazione della portata. Il glicerolo liquido può essere aggiunto direttamente nel serbatoio di miscelatura. Qualora venga aggiunto ad una miscela secca si consiglia di dotarsi di un serbatoio di miscelatura più piccolo per mescolare il glicerolo in acqua con rapporto 1:2 prima di aggiungerlo alla mistura.

Solidi e solubili di distilleria

I solidi e solubili di distilleria in Europa sono principalmente derivati del grano. Si tratta dei residui della trasformazione del grano in amido di grano e della successiva trasformazione in etanolo. Si presentano come una pasta semiliquida e spesso vengono disseccati e pellettizzati per fini di movimentazione e conservazione. A seconda dell'origine, i solidi e solubili di distilleria possono presentare diversi contenuti di proteine grezze (18 – 37%), grassi grezzi (3 – 14%) e fibre grezze (7 – 14%). In ultima analisi i solidi e solubili di distilleria non sono prodotti standardizzati.

Negli Stati Uniti circa il 45% di tali sostanze è utilizzato in mangimi per animali da latte e il 35% in mangimi per bestiame da carne. L'utilizzo per il pollame ed i suini è agli albori, anche se se ne ipotizza un maggior uso dato l'aumento del prezzo delle proteine vegetali.

Mangimi per animali da latte

Vale la pena sottolineare che i solidi e solubili di distilleria contengono una discreta quantità di proteine di rumine indegradabili (UDP o *proteine by-pass*) che varia tra il 40 ed il 68%. Di conseguenza, i solidi e solubili di distilleria eguagliano o superano i valori di UDP delle farine di soia e colza.

Uno studio pratico svolto in Germania sulla somministrazione di solidi e solubili di distilleria (2 kg per capo al giorno) a vacche da latte non ha evidenziato alcun effetto negativo sulla resa di latte e sui suoi ingredienti costitutivi (proteine e lipidi) ad alti livelli di lattazione (> 35 kg/capo/giorno).

Nel caso degli animali da latte si registrano i seguenti vantaggi:

- alti livelli di carboidrati digeribili
- buona fonte di energia
- alti livelli proteici e di UDP
- riduzione dell'acidosi attraverso la diluzione delle diete a base di alti livelli di amido
- sostituzione di altre fonti proteiche più costose
- alta appetibilità, aumento dell'ingestione di mangime

Mangimi per suini

Nei suini da ingrasso, diversi studi hanno dimostrato che livelli fino al 15% non hanno un impatto negativo sui parametri di crescita e sull'efficienza dei mangimi. I solidi e solubili di distilleria possono sostituire principalmente la farina di soia e di colza. Il bilancio di aminoacidi digeribili nella dieta deve essere considerato meticolosamente, poiché i solidi solubili di distilleria hanno uno scarso contenuto di alcuni aminoacidi essenziali, quali la lisina e la treonina. L'uso non è molto consigliato per i suinetti.

Mangimi per pollame

I solidi e solubili di distilleria possono essere utilizzati con successo anche nei mangimi per il pollame. Nelle pollastre e nelle galline ovaiole, livelli rispettivamente fino al 20% e al 15% non hanno mostrato alcun effetto negativo sulla performance generale, sullo stato di salute e sul contenuto di materia secca negli escrementi. L'uso di tali sostanze è invece limitato per i polli da allevamento che crescono rapidamente.

Raccomandazioni per l'uso di solidi e solubili di distilleria (a base di grano)

Polli d'allevamento	< 5%
Galline ovaiole	< 15%
Pollastre	< 20%
Vacche da latte	< 20%
Bestiame da carne	< 30%
Suinetti	< 0 – 5%
Suini da ingrasso	< 10 – 15%
Scrofe in gestazione	< 10%
Scrofe in lattazione	< 5%

In virtù dell'alta variabilità dei prodotti di diverse aziende e di quelli derivati da materie prime diverse, l'uso ottimale di solidi e solubili di distilleria dipende notevolmente dalla conoscenza del profilo nutrizionale del prodotto disponibile. In particolare, il livello di aminoacidi digeribili deve essere controllato con estrema cura.

UTILIZZO ALIMENTARE NEL SUINO DEI COPRODOTTI DELL'INDUSTRIA DEI BIOCARBURANTI

GIUSEPPE BARICCO

Medico Veterinario Libero Professionista, Torino, giuseppe@baricco.it

RIASSUNTO. I prodotti derivanti dalla produzione del bioetanolo da cereali (DDGS) possono essere utilizzati nei mangimi per suini a dosi fino al 5% nei mangimi per suinetti, fino al 15% negli ingrassi e fino al 20% nei riproduttori. Occorre tuttavia tenere sempre bene a mente nel DDGS si concentra di circa tre volte tutto ciò che amido non è, inclusi gli NSP, gli oli e le eventuali contaminazioni (ad esempio micotossine) del cereale di origine.
Questo genera la necessità di utilizzare artifici di formulazione (uso di complessi enzimatici polivalenti) e tecnologie produttive (controlli stringenti sulle micotossine).
I prodotti derivanti dalla produzione del biodiesel sono principalmente la farina di colza ed il glicerolo. La farina di colza può entrare nei mangimi in proporzioni variabili dal 5 fino al 15%, a causa del limitato contenuto in glucosinolati. Numerose ricerche sono disponibili per attribuire un affidabile valore nutritivo alla farina di colza nei mangimi per suini.
Il glicerolo si può utilizzare in due applicazioni differenti: in fase di finissaggio al fine di migliorare il profilo acidico del grasso di deposito, e prima di condizioni di stress (quale il trasporto) sfruttando il suo potenziale di iperidratazione dell'organismo, che è stato dimostrato nella nutrizione sportiva dell'uomo.
In Italia le regole di nutrizione dettate dal disciplinare produttivo del prosciutto di Parma limitano fortemente le possibilità di utilizzo dei coprodotti dell'industria dei biocarburanti.

Parole chiave: suini, mangimi, bio-etanolo, biodiesel

SUMMARY. *Products deriving from bioethanol production from cereals (DDGS) can be used in swine feeds up to 5% in piglet feeds, up to 15% in fatteners, and up to 20% in breeders. It is necessary to keep always in mind that DDGS concentrate about three times more all what in a cereal is not starch ,therefore including NSP, oils and mycotoxins. For this reason the use of multiple active enzymes is recommended, as well as an increased control in the mycotoxin contamination.*
From biodiesel production originate increased quantities of rapeseed meal and glycerol. Rapeseed can be used in percentages ranging from 5 up to 15%, due to the low level of glucosinolates of modern productions, and due to well established nutritional values for this ingredient. Glycerol can be used in two application, one related to the improvement of the acidic profile of deposit fats in the swine carcass, reducing the insaturation level, and before stress situations, like transports, using its hyperhydrating properties, that have been shown in human athlets. In Italy Parma Ham production rules strongly limit a wide use of biofuel coproducts in swine nutrition.

Keywords*: swine, feed, bio-ethanol, biodiesel*

PREMESSA

Sul finire degli anni '60 del secolo scorso si affacciò con clamore sulla scena del dibattito alimentare l'opportunità offerta dalle così dette "bioproteine" ovvero, in lingua inglese, "single cell proteins". Si trattava di proteine prodotte da organismi unicellulari, a partire da substrati alquanto differenti. Tra essi il petrolio – o meglio alcuni coprodotti della sua

raffinazione – rappresentò l'opportunità ritenuta al tempo più intrigante sia da parte del potere politico che dal versante economico. Società di rilevanza mondiale come la British Petroleum investirono grandi cifre nello sviluppo della tecnologia correlata, identificando anche il nome commerciale (Toprina) ed i primi siti produttivi (Cap de Lavera, F) per questo nuovo alimento. Inizialmente concepiti come nuovi alimenti destinati all'uomo, questi concentrati proteici originati dalla fermentazione microbica su substrato derivante dal petrolio vennero successivamente orientati come alimenti per gli animali.
Anche in Italia le cose si mossero, e vennero concessi finanziamenti pubblici per un totale non inferiori ai 400 miliardi di lire (… dell'epoca!) destinati a supportare la costruzione di due insediamenti industriali per la produzione di bioproteine da petrolio, la Italproteine (Anic e British Petroleum) a Sarroch (Cagliari) e la Liquichimica Biosintesi (Gruppo Ursini) a Saline di Montebello Jonico in Calabria.
Le ricorrenti crisi petrolifere dell'inizio degli anni '70, e l'affacciarsi nel dibattito alimentare di nuove consapevolezze relativamente alla gestione del rischio determinarono, negli anni immediatamente successivi, la rovinosa caduta di tutti i progetti correlati alle bioproteine.
Infatti il nuovo costo del petrolio le rese antieconomiche da produrre, e nello stesso tempo i consumatori furono indotti a porsi delle domande – alle quali non fu possibile fornire risposte esaustive – in merito al potenziale di rischio connesso al consumo, diretto o indiretto attraverso gli animali allevati , di queste sostanze. Le Società implicate, stante la non convenienza economica, smisero di finanziare studi, e la cosa finì così, in una sorta di processo di autoconsunzione. Fu questo probabilmente il primo caso di applicazione (ancora involontaria) del "principio di precauzione" che successivamente ha guidato la quasi totalità delle scelte europee in tema di nutrizione umana ed animale, mentre certamente non fu né il primo né l'ultimo caso di finanziamenti pubblici sprecati in progetti non lungimiranti e neppure economicamente sostenibili.
A distanza di trent'anni da quelle vicende, ci ritroviamo in uno scenario diametralmente opposto: dal mito dell'alimento derivato dal petrolio si è giunti alla realtà industriale del carburante derivato dagli alimenti.
Cosa sia successo è nella coscienza di chiunque legga i giornali: la certezza della prossima fine delle fonti di petrolio, e la consapevolezza dei probabili danni ambientali derivanti dalla loro combustione ha generato la necessità di identificare strade indipendenti dal petrolio per l'approvvigionamento energetico.
Tra le diverse opzioni di scelta, ha sorprendentemente trovato molti accoliti entusiasti quella di sostituire una parte della benzina con alcol etilico derivato dalla fermentazione di cereali o canna da zucchero ("bioetanolo"), e una parte del gasolio con un carburante derivato dalla trasformazione industriale dell'olio prodotto dalle oleaginose, in particolare in Europa la colza ("biodiesel"). Questa scelta, di carattere politico, ha generato l'inizio di produzioni industriali rilevanti, particolarmente nel continente americano, sia a Nord che a Sud.
In Europa, stante la vigenza della la Direttiva CE 30/2003, modificata con comunicato della commissione UE del 10 gennaio 2006, si affacciano ora produzioni industriali di biocarburanti via via crescenti: partendo da matrici vegetali, è ovvio che questi processi generino dei sottoprodotti, ed è logico che i destinatari primi per la loro valorizzazione economica siano i mangimi destinati agli animali in produzione zootecnica.
In Italia è previsto l'avvio di diversi impianti per la produzione di bioetanolo a partire da mais, per una produzione totale prevista di un milione di tonnellate di bioetanolo/anno, in parte di nuova costruzione, come quello previsto in provincia di Alessandria da parte del Gruppo Ghisolfi (potenzialità: 200.000 tons/anno di etanolo, pari a 600.000 tonnellate di cereali), in parte attraverso la più volte ipotizzata riconversione industriale dei dismessi zuccherifici dispersi sul territorio nazionale.

In particolare si offrono al mercato DDGS (Distiller's Dried Grains with Solubles , residuo essiccato della fermentazione dei cereali per la produzione del bioetanolo), Glicerolo (coprodotto della trasformazione degli oli in carburanti diesel), e maggiori quantità di farina di estrazione di colza (oleaginosa particolarmente adatta alla produzione dell'olio).
Tutti gli animali allevati, inclusi i suini, possono consumare questi prodotti, tuttavia per la specie suina, come allevata in Italia, sono necessarie di alcune specifiche considerazioni.
La gran parte dei suini allevati in Italia sottostanno al Disciplinare produttivo del Prosciutto di Parma DOP, il quale, al capitolo C.7.3 relativo alla alimentazione consente l'uso dei Distillers limitatamente al 3% solo fino ad 80 kg di peso, non consente l'uso della farina di colza in nessuna fase di allevamento, e neppure fa cenno al glicerolo come alimento (mentre esso appare di libero uso come additivo per mangimi) . Le farine di estrazione di girasole, invece, sono consentite fino all'8% di inclusione.
Dunque, la maggior parte di quanto si andrà a dire in merito a distillers e colza nei mangimi per accrescimento-ingrasso, sarà utilizzabile solo in quelle situazioni che non ricadono nei disciplinari produttivi….

DISTILLATI ESSICCATI E NUTRIZIONE DEI SUINI

Sul mercato europeo delle materie prime sono disponibili DDGS provenienti sia dalla lavorazione del mais che da quella del grano.
La loro origine è principalmente quella dei Paesi nei quali la trasformazione dei cereali a fini di fermentazione è particolarmente attiva, e cioè segnatamente l'Austria, la Germania ed alcune nazioni est-europee, sia intra che extra CE.
La produzione italiana è per ora modesta, ed originata da processi produttivi non finalizzati alla filiera dei carburanti.
A titolo di pura introduzione, si riportano i valori nutrizionali attribuiti ai DDGS di mais e di frumento da parte di due differenti ed affidabili fonti, quali l'Università del Minnesota per i distillers di mais (www.ddgs.umn.edu/) , ed il recente database reso disponibile online da INRA, AFZ ed Ajinomoto Eurolysine per i distillers di frumento (www.evapig.com/x-home-en)

Tabella 1. Valori nutrizionali di riferimento per i DDGS di mais e di grano

	Prot. Gregge %	Lipidi greggi %	Fibra greggia %	Ceneri %	Lisina %	DE suini Kcal
DDGS grano	33.5	6.5	9.2	3.6	1.05	3000
DDGS mais	30.8	11.2	7.4	5.7	0.97	3550

Come si può ben capire, vi sono delle imperfette corrispondenze tra le diverse fonti, in particolare per ciò che riguarda l'attribuzione del valore energetico.
La prima considerazione quindi da fare, con riferimento a questa classe di prodotti, è che essi non sono ancora stabilizzati sotto il profilo dell'omogeneità qualitativa: vi sono importanti differenze tra DDGS di diverse origini per quanto riguarda il seme di origine (grano o mais, o altri cereali, sorgo in particolare), questo apparendo del tutto comprensibile.
Vi sono però, a pari tipo di cereale di origine, delle differenze importanti in funzione dell'impianto in cui la lavorazione avviene, con particolare riferimento alle tecnologie utilizzate per l'essiccazione, che si riflettono sul colore dei DDGS, essendo più scuri quelli

sottoposti ad elevate temperature e più chiari quelli essiccati più correttamente senza eccessivi shock termici. In questo l'esame comparato delle caratteristiche dei prodotti come escono dai 49 impianti monitorati dalla già citata Università del Minnesota è piuttosto illuminante sul grado di variabilità di questo prodotto.
Sullo stesso tema, ma focalizzandosi in particolare sulla digeribilità dei nutrienti nei suini all'ingrasso è stato pubblicato nel 2006 un esperimento interessante e conclusivo:

Tebella 2. Caratteristiche di differenti fonti di DDGS di mais nel suino (adattato da da *Fastinger e Mahan , 2006)*

Fonte	1	2	3	4	5
Indice di colore(*)	28.0	34.0	39.0	52.0	55.0
Proteine grezze %	27.0	28.2	29.8	27.3	28.3
Lisina %	0.48	0.51	0.70	0.76	0.75
Dig. Apparente Lis. %	29.3	24.6	47.1	52.3	46.0
Dig. Vera Lis. %	43.6	38.2	57.3	61.5	55.4
Dig. dell'energia lorda %	66.7	68.1	67.1	68.9	69.2

(*) Minolta Hunter L test = (0= nero, 100= bianco)

Ben si comprende come ad un progressivo inscurimento della farina di DDGS (indice dei diversi processi industriali) si accompagni un corrispondente degradamento della digeribilità della componente proteica: il comportamento, qui riportato per la lisina, non è diverso per ciò che riguarda la digeribilità degli alti aminoacidi e delle proteina nel suo insieme. Per ciò che attiene la utilizzabilità del potenziale energetico dei DDGS, al contraio non pare – come è anche comprensibile – che l'intensità del trattamento termico intervenga sulla digeribilità della frazione lipidica dei distillers.
Per queste ragioni i riferimenti bibliografici ed i rapporti di prova devono sempre essere messi in relazione con le specifiche caratteristiche degli ingredienti che si vanno ad utilizzare concretamente, pena sorprese anche spiacevoli in termini di prestazioni ottenibili.
Sul mercato italiano vengono dunque offerti DDGS da mais di gradazione 35/6/9 (cioè con un contenuto, rispettivamente, del 36% in proteine, del 6% in grassi, e del 9% in cellulosa) e di gradazione 28/11/8 (proteine 28%, grassi 11%, fibra 8%), mentre per il grano vengono offerte gradazioni 32/9/9 e 35/6/7!
E' facile comprendere come sia difficile utilizzare questi DDGS senza essere selettivi nella scelta e costanti nelle fonti di approvvigionamento.
Un'altra considerazione da fare è che nella quota di concentrazione di sostanze nutritive presenti nel cereale di origine che si osserva al termine della produzione del bioetanolo, la quale può essere – molto schematicamente – così riassunta:

1. Asportazione dal cereale della percentuale di amido presente (circa il 65/70% in peso della granaglia)
2. Sua trasformazione in etanolo (con una resa di circa il 50%, così che da un kg di cereale si producono 300-350 g. di etanolo) con perdita della restante parte sotto forma di gas
3. Residuo come borlanda da essiccare di un concentrato contenente tutto ciò che non è amido ed era presente nel cereale, ovviamente concentrato di circa tre volte (proteine x 3, grassi x3, fibra x3)

ebbene queste non sono le uniche componenti che si concentrano!
Purtroppo, oltre ai componenti nutrtivi "buoni" si concentrano anche quelli meno favorevoli, e segnatamente le micotossine eventualmente presenti nei cereali di origine (che non vengono disattivate dai processi industriali), e le frazioni di polisaccaridi non amidacei (NSP), il cui controllo appare particolarmente importante nei DDGS provenienti dal grano, ma che – essendo concentrati di tre volte rispetto al cereali di origine – assumono un ruolo ed un significato evidente anche nel caso dei DDGS di mais.
Come ultima considerazione sulle caratteristiche nutrzionali dei DDGS occorre ricordare il contenuto in fosforo, che appare particolarmente elevato (circa lo 0,8%). Questo ne fa un ideale candidato alla supplementazione con la fitasi, la quale – visti gli ultimi andamenti dei prezzi delle fonti minerali di fosforo – è ormai divenuta uno standard nella composizione dei mangimi per suini anche nel nostro Paese. Concentrazioni un po' più alte del normale in NaCl ed in S, che pure sono caratteristiche dei DDGS, non assumono, ai livelli normali di inclusione nelle diete, caratteristiche di inusualità tali da determinare l'obbligo di una particolare attenzione da parte del formulista.
Dette e ben chiarite tutte le caratteristiche di cui sopra, ne derivano le seguenti percentuali massime di inclusione raccomandabili nelle diverse fasi di allevamento:

- Suinetti inferiori ai 15 kg : 0%
- Suinetti da 15 a 30 kg: 5 %
- Suini in accrescimento ingrasso: 15 %
- Riproduttori suini: 10 - 20%

I limiti più alti, pur ritrovati e documentati anche a livelli ben superiori in letteratura, andrebbero tuttavia raggiunti solo nelle condizioni in cui vi sia il massimo di certezze e di garanzie sulla composizione qualitativa dei prodotti utilizzati e sulla loro costanza.
La percentuale lipidica dei DDGS, come è ovvio, è caratterizzata da un elevato livello di insaturazione, ciò che li rende "pericolosi" sotto il profilo dell'influenza sulla qualità dei grassi di deposito, come più volte dimostrato:

Tabella 3. Influenza della percentuale di inclusione di DDGS di mais sulle prestazioni e sulla qualità della carcassa di suini (da 28 a 115 kg di p.v), adattato da *Whitney et al., 2006*

DDGS % (formule equalizzate)	0	10	20	30
Incr Peso Giorn. g	862	859	827	808
Resa mangime %	36	36	36	34
Resa carcassa %	73.3	72.8	72.1	71.9
N° Iodio pancetta	66.8	68.6	70.6	72.0

Quanto sopra ricordato con riferimento alla concentrazione di elevate quantità di NSP nei DDGS rende quanto mai opportuno l'uso di complessi enzimatici all'uopo progettati, che favoriranno la digestione contribuendo allo stesso tempo a controllare lo sgradevole effetto di maggiore collosità delle feci che si osserva regolarmente quando i DDGS vengono impiegati in dosi significative, segno visibile di una elevata presenza di NSP nell'alimento.
Della fitasi si è già detto: essa è in grado di aggiungere riscontro economico ai DDGS valorizzandone adeguatamente il contenuto naturale in fosforo, mentre il ricordato "rischio" micotossine deve essere tenuto in particolare conto, vuoi intensificando il livello di

controlli analitici, vuoi inserendo nel mangime opportune dosi di un buon agente legante polifunzionale. In un caso come l'altro, tuttavia, la maggiore attenzione dovuta al problema delle contaminazioni fungine nei DDGS deve essere tenuta in adeguato conto economico quando se ne consideri la possibilità di uso nei mangimi per suini.

GLICEROLO E NUTRIZIONE DEI SUINI

Nell'ambito di una discussione sull'uso dei co-prodotti dell'industria dei biocarburanti in ambito suincolo italiano, il glicerolo (o glicerina) merita una particolare attenzione, in quanto, pur non essendo citato fra i componenti ammessi dal disciplinare del prosciutto di Parma, tuttavia esso è presente ed autorizzato nel Registro Comunitario degli Additivi ex Reg. CE 1831/2003 come additivo tecnologico nell'ambito del gruppo "Agenti emulsionanti, stabilizzanti, addensanti e gelificanti" E 422, senza limiti di dosaggio o di impiego in tutte le specie animali. Per questo, fino ad espresso parere contrario delle preposte Autorità, l'uso dovrebbe essere libero anche nei suini destinati ai circuiti tutelati DOP.
La qualità del glicerolo grezzo (che è la materia prima reperibile sui mercati, un liquido gelatinoso più o meno opaco, di sapore dolciastro e prontamente solubile in acqua) non è stata studiata con particolare intensità, e si può osservare in generale che, come per il caso dei DDGS, anche per esso i parametri qualitativi dipendano in modo non marginale dalle tecnologie e dalle matrici utilizzate nei diversi impianti per la produzione del biodiesel.
Il contenuto in glicerolo puro varia dall'85 all'88% (anche se il limite normativo è dell'80%), il contenuto in metanolo deve essere inferiore allo 0,5% (anche se i prodotti in commercio di solito si situano tra lo 0,1 e lo 0,3%).
Il glicerolo grezzo ha infine un contenuto in ceneri tra il 5 ed il 7%, per circa la metà costituito da NaCl, la cui presenza deve essere tenuta in conto, stanti le percentuali praticabili di uso.
Nella nota del Gruppo Tecnico Legislativo dell'Assalzoo del 28 settembre 2007 il valore energetico della glicerina grezza sul tal quale viene stimato in 3600 -3700 Kcal di DE in suini con sistema digestivo sviluppato. Per i suinetti (fase per la quale il glicerolo non trova particolari e specifiche indicazioni) tale valore andrebbe leggermente ridotto (3500 Kcal DE), rendendone quindi ancor meno conveniente l'uso. Un recente studio (*Lammers et al., 2008)* pubblicato negli US attribuisce invece al glicerolo grezzo un valore di DE pari a 3350 Kcal/kg. Si tratta di valori tra loro piuttosto differenti, ed è quindi evidente che non vi è una posizione univoca a livello mondiale sull'argomento.
Al di fuori del valore energetico, il glicerolo grezzo non ha alcun altro valore nutritivo, né dal punto di vista proteico nè da quello della capacità di ingombro.
Sulla base dei non molti lavori pubblicati, si può affermare che i parametri di prestazione non vengono negativamente influenzati per presenze fino al 10% di glicerolo grezzo nei mangimi (… ammesso di essere tecnologicamente in grado di incorporarlo!) , purchè le diete siano accuratamente ribilanciate, oltre che dal punto di vista energetico, anche da quello proteico ed aminoacidico in particolare.
L'uso del glicerolo come ingrediente, quindi, è strettamente vincolato da un lato al suo prezzo (che è soggetto a variazioni anche molto alte nell'arco dell'anno), e dall'altro al maggior consumo di soya o di altri ingredienti proteici che la sua introduzione in formula necessariamente comporta. Vi sono inoltre riscontri bibliografici sulla possibilità, da parte del glicerolo, di migliorare la qualità del grasso di deposito, diminuendone il grado di insaturazione: questo parrebbe quindi di grande interesse in Italia.
Recentemente è stato pubblicato un interessante esperimento su suini pesanti italiani (*Della Casa et al., 2008)*, nel quale si sono misurati gli effetti della sostituzione "tout court" di parte (rispettivamente: 5 o 10%) del mais contenuto nelle formule con glicerolo, sia per

una somministrazione protratta per tutto il ciclo di ingrasso, sia per una somministrazione limitata al solo periodo di finissaggio, oltre i 120 kg di peso.
In generale gli Autori hanno messo in evidenza una tendenza del glicerolo – utilizzato nel modo sopra descritto – a ridurre le prestazioni di allevamento se utilizzato al 10%, ed una sua ininfluenza se utilizzato al 5%:

Tabella 4: Prestazioni di suini pesanti italiani con diete contenenti diversi livelli di glicerolo (*Della Casa et al., 2008)*

	Controllo	Glic 5% ciclo	Glic 10% ciclo	Glic 5% finiss	Glic 10% finiss
IPG g.	790 (a)	795 (a)	756 (b)	780 (ab)	757 (b)
ICA (SS)	2,84 (c)	2,84 (c)	2,97 (a)	2,89 (bc)	2,95 (ab)

Nello stesso lavoro gli Autori hanno misurato numerosi parametri qualitativi delle carcasse, non rilevando particolari effetti, nè sulle carcasse calde e fredde, nè sulle rese in prosciutti, sul calo di stagionatura e sui parametri di "drip loss" dei lombi.
In particolare sul grado di insaturazione dei grassi di deposito non sono state evidenziate differenze sul numero di Iodio, e solo marginali variazioni nel profilo acidico:

Tabella 5: Composizione acidica del tessuto adiposo sottocutaneo di suini pesanti italiani con diete contenenti diversi livelli di glicerolo (*Della Casa et al., 2008)*

%	Controllo	Glic 5% ciclo	Glic 10% ciclo	Glic 5% finiss	Glic 10% finiss
Acido oleico	44.47	45.66	46.29	45.26	45.02
Acido linoleico	13.65	13.24	12.91	12.97	12.6
Monoinsaturi tot	46.88	48.18	48.85	47.82	47.63
Polinsaturi tot	14.52	14.1	13.78	13.81	13.4

Si tratta di risultati alquanto scarsi, che necessitano però di una revisione critica, per non cadere in errore nella valutazione complessiva.
Infatti l'introduzione del glicerolo in questo esperimento è avvenuta senza ribilanciare le formula dal punto di vista proteico: la sostituzione peso per peso del 10% di mais con glicerolo ha portato ad una riduzione del titolo proteico dei mangimi di circa lo 0,85% in termini assoluti, a parità invece di valore energetico. Questa manipolazione della formula è largamente sufficiente a spiegare le riduzioni di prestazione osservate.
Allo stesso modo, occorre valutare il contenuto di acido linoleico della dieta di controllo per poter dare un significato preciso alla inconsistente riduzione dello stesso acido osservata nel grasso di deposito: il mangime di finissaggio di controllo aveva infatti un contenuto di C 18:2 assolutamente al di sotto dell'area di "rischio" (1,56% sul tal quale), come testimoniato dal livello rilevato nel grasso di deposito (13,65%). E' quindi ovvio che, in queste condizioni, la supplementazione con glicerolo sia stata solo marginalmente utile nel controllo del parametro "numero di Iodio" in questo esperimento:

Tabella 6. Alcune caratteristiche del mangime di finissaggio di controllo e della tesi "glicerolo 10%" (*Della Casa et al., 2008)*

	Controllo	Glicerolo 10%
Mais %	55	45
Orzo %	20,44	20,44
Soia %	11,5	11,5
Crusca %	10	10
L-lisina %	0,16	0,16
Premix Vit/Min %	2,9	2,9
Glicerolo %	0	10
Proteina grezza %	14,02	13,12
DE Kcal	3230	3248
Lisina %	0,74	0,71
Acido linoleico %	1,56	1,36

Stante la condizione di utilizzabilità legale del glicerolo anche all'interno dei circuiti tutelati, le sue proprietà di fornire energia riducendo l'apporto di acidi grassi è da tenersi in debito conto, particolarmente in quelle condizioni di allevamento nelle quali il problema di un eccessivo grado di insaturazione dei grassi di deposito si ponga con ricorrente frequenza.
Il glicerolo viene ampiamente utilizzato nella pratica della nutrizione sportiva per la specie umana, al fine di provocare uno stato di iperidratazione negli atleti, per prepararli ad un prolungato esercizio fisico (la dose utilizzata è di 1-1,2 g. di glicerolo per kg di peso, insieme alla assunzione di 1,5 litri di acqua 60 -120 minuti prima dell'evento sportivo. Simili effetti vengono attesi, nella nutrizione militare, per i soldati impegnati in attività intense in zone con elevate temperature ambientali per lunghi periodi. Tale effetto di ottiene, stando alla letteratura, principalmente attraverso una azione di marcata riduzione della diuresi, e conseguente transitoria e parziale inibizione dell'urinazione, incremento del volume circolante, e conseguente contrasto della disidratazione.
Svariate verifiche applicative sono possibili, nell'allevamento suinicolo, per questa pratica tipicamente nutraceutica : riduzione dello stress da trasporto, sia per animali da vita che da macello, contrasto della disidratazione nelle scrofe lattanti con temperature ambientali elevate, supporto nutrizionale a soggetti in accrescimento soggetti a challenge enterico di varia natura. Per ora non vi sono echi di studi di questo tipo, tuttavia le informazioni sono ben presenti nella sezione "Biodiesel feeds" nel sito web dell'Università del Minnesota (http://biodieselfeeds.cfans.umn.edu/), e non è pertanto difficile immaginare che si avranno presto notizie ed informazioni anche su questo versante.

FARINA DI COLZA E NUTRIZIONE DEI SUINI

L'incrementata produzione continentale di biodiesel genererà una maggiore disponibilità di farine di estrazione, o pannelli, diversi dalla soya, la cui coltivazione pare meno adatta dal punto di vista pedoclimatico alle latitudini europee.

Si avrà pertanto una maggiore disponibilità di farina di estrazione di colza, e di farine di estrazione di girasole, a vari livelli di decorticatura.
Allo stato attuale i due prodotti presi in considerazione per la nutrizione dei suini sono la farina di estrazione di colza e la farina di estrazione di girasole parzialmente decorticata, le cui caratteristiche nutritive fondamentali vengono riportate in tabella:

Tabella 7. Caratteristiche nutritive

	Colza f.e.	Girasole decorticato f.e.	Soya f.e.
Proteine %	33-35	31-33	43-44
Fibra grezza %	11-12	21-23	7-8
DE suini Kcal	2950	2300	3500
Lisina %	2,03	1,18	2,74
Met. + Cist. %	1,64	1,27	1,23
Treonina %	1,53	1,21	1,72
Triptofano %	0,43	0,45	0,59

Rapportando i profili aminoacidici come percentuali della proteina, ne deriva la seguente tabella di confronto:

Tabella 8. Profilo aminoacidico espresso come percentuale della proteina

	Colza f.e.	Girasole decorticato f.e.	Soya f.e.
Lisina %	6,05	3,68	6,32
Met. + Cist. %	4,82	3,96	2,82
Treonina %	4,5	3,78	3,95
Triptofano	1,26	1,40	1,35

Dall'esame di questi dati appare chiaro quali siano – al di là dei già ricordati vincoli di uso correlati alla adesione ai disciplinari produttivi – le caratteristiche di questi potenziali sostituti della farina di soya nei mangimi per suini: da un lato la riduzione del valore energetico ed il contestuale incremento della fibra grezza genererà la necessità di ricorrere in modo più massiccio all'uso dei grassi, oppure alla limitazione nell'uso di altri sottoprodotti come i cruscami, dall'altro sarà necessario controllare con accuratezza il profilo aminoacidico dei mangimi, perchè sia la colza che soprattutto il girasole sono proporzionalmente meno ricchi in lisina e sono caratterizzati da un profilo aminoacidico molto diverso rispetto all'ingrediente di riferimento.
Con attenzione particolare alla colza, occorre dire che le merci presenti sul mercato attualmente come "tipo 00", le quali rappresentano la quasi totalità dell'offerta, presentano tenori in glucosinolati mediamente bassi, tra i 10 ed i 15 mmoli/g, tali da garantire l'assenza di caratteristiche antinutrizionali a questo alimento. Questo genera maggiori livelli di sicurezza rispetto all'uso della farina di colza nei mangimi per suini, dato che la letteratura recente amplierebbe ancora le percentuali di uso possibili:
Soprattutto i ricercatori francesi si sono impegnati a meglio esplorare e tenere aggiornate le caratteristiche delle farine di colza: molto recentemente è stato pubblicato (*Quiniou et al., 2008)* un lavoro sugli effetti dell'inclusione del 10% di farina di colza a 14-16 μmoli

/g di glucosinolati inserito sia nei mangimi di gestazione che di lattazione sulle prestazioni riproduttive misurate su tre successivi cicli riproduttivi su un totale di 4 bande di 24 scrofe ciascuna, non rilevando alcuna differenza significativa rispetto al controllo sui parametri di assunzione alimentare, numero dei nati e degli svezzati, giorni di interparto e prestazioni dei suinetti in sala parto. In particolare in questo studio si conferma che se l'assunzione giornaliera di glucosinolati si mantiene al di sotto delle 5000 mmoli/capo/giorno in gestazione e delle 10000 mmoli/capo/giorno in lattazione, non sono da attendersi influenze negative sulle prestazioni riproduttive delle scrofe e sullo stato funzionale delle loro tiroidi.
Anche i suinetti in post-svezzamento sono oggetto di investigazione sulla loro compatibilità con le moderne farine di colza. *Royer et al., (2008)* hanno presentato un lavoro su suinetti del peso di 12 kg mantenuti in condizioni ambientali ottime o scadenti, ed alimentati con un mangime di controllo contenente il 3% di farina di colza oppure con un mangime contenente il 15% di colza. I risultati hanno mostrato che in condizioni ottimali di ambiente la colza a dose elevata ha depresso il consumo dell'alimento (g. 1005/giorno vs g. 1091, $p<0,01$) ed in proporzione l'accrescimento giornaliero (g. 591/giorno vs g. 632, $p<0,05$), mentre in cattive condizioni ambientali queste differenze non si sono potute mettere in evidenza (consumo g. 935 vs 969, NS, e crescita g. 554 vs 570, NS). Gli stessi mangimi sono stati controllati in 6 diversi allevamenti commerciali, ed anche in questo caso non si è potuto mettere in evidenza una differenza significativa nel consumo alimentare (g. 959 vs 939/giorno, NS) e nelle crescite (g. 581 vs 590/giorno). Gli Autori hanno concluso con una raccomandazione massima nell'uso della colza nei mangimi per suinetti da 10 a 25 kg del 12%.
Questi ed altri lavori di verifica consentono – ove normativamente possibile – di estendere gli spazi di uso per questa materia prima rispetto alle attuali prudenti raccomandazioni, consentendone un uso più intenso rispetto al recente passato:

Tabella 9. Farina di colza, percentuali di uso nei mangimi per suini

	Uso "prudente"	Uso "intenso"
Suinetti 12-30 kg	--	Fino a 10 %
Ciclo ingrasso	Fino a 6%	Fino a 15%
Riproduttori	Fino a 6%	Fino a 10%

CONCLUSIONI
La possibile introduzione sul mercato di co-prodotti dell'industria dei biocarburanti potrà vedere anche i suini fra le specie animali deputate al loro smaltimento, essendo possibile somministrare loro sia i distillers, che il glicerolo, che le farine di estrazione di oleaginose diverse dalla soya.
Il glicerolo grezzo ha mostrato nelle ricerche eseguite anche una possibilità di uso come "correttore" del grado di insaturazione dei grassi di deposito delle carcasse suine, ed un potenziale come elemento dietetico nella idratazione, mentre i DDGS , a causa del contenuto relativamente elevato in olii, impongono alcune cautele per ciò che riguarda la qualità delle carcasse ottenute, tenendo in particolare conto il livello totale di acido linoleico dei mangimi ottenuti. La farina di colza ha visto negli ultimi tempi diminuire costantemente il livello di glucosinolati , in tal modo rendendone più sicuro l'uso in tutte le specie animali, incluso il suino.
In ogni caso, è necessario per utilizzare questi ingredienti provvedere ad un accurato bilanciamento del mangime, sia sotto il profilo energetico che aminoacidico.

BIBLIOGRAFIA

Fastinger M.D., Mahan D.C. Determination of the ileal amino acid and energy digestibilities of corn distillers grains with solubles using grower-finisher pigs. J. Anim. Sci. 2006. 84:1722-1728

Whitney M.H., Shurson G.C., Johnston L.C., Wulf D.M., Shank C. Growth performances and carcass characteristics of grower-finisher pigs fed high-quality corn distillers grains with solubles originating from a modern Midwestern ethanol plant. J. Anim. Sci. 2006.84: 3356-3363

Lammers, P. J. , Kerr, B. J. , Weber, T. E. , Bregendahl, K. , Lonergan, S. M. , Prusa, K. J. , Ahn, D. U. , Stoffregen, W. C. , Dozier, W. A., III , Honeyman, M. S. Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin-supplemented diets. J. Anim. Sci. 2008, 86: 2962-2970.

Lammers, P. J. , Kerr, B. J. , Weber, T. E. , Dozier, W. A., III , Kidd, M. T. , Bregendahl, K. , Honeyman, M. S. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. J. Anim. Sci., 2008, 86, 602-608.

Della Casa, G. , Bochicchio, D. , Faeti, V. , Marchetto, G. , Poletti, E. , Rossi, A. , Garavaldi, A. , Panciroli, A. , Brogna, N. Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. Meat Science, 2009, 81, 238-244

Assalzoo. Gruppo Tecnico Legislativo. Posizione "Utilizzo del glicerolo grezzo come materia prima" Roma, 28 settembre 2007, 1-5

Coutts A, Reaburn P, Mummery K, Holmes M. The effect of glycerol hyperhydration on olympic distance triathlon performance in high ambient temperatures. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2002 Mar;12(1):105-19.

Wagner, D.R. Hyperhydrating with glycerol: Implications for athletic performance.. J. Amer. Dietetic Assoc., 1999, 99, 207-212

Quiniou N., Crepon K., Quinsac A., Evrard J., Peyronnet C., Bourdillon A., Royer E., Etienne M. Performances à long terme d'un troupeau de truies alimentèes avec un tourteau de colza industriel pendent la gestation et la lactation, Journèes de la Recherche Porcine en France, 2008, 40, 167-174

Royer E., Gaudre D. Influence du taux de tourteau de colza dans l'aliment de 2me age sur les performances du porcelet, Journèes de la Recherche Porcine en France, 2008, 40, 175-182

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

VISIONE MODERNA DELLA NUTRIZIONE LIPIDICA DEL SUINO

A MODERN APPROACH OF THE LIPID SUPPLEMENTATION IN SWINE NUTRITION

CARLO CORINO

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, via Celoria 10, 20133 Milan, Italy

PAROLE CHIAVE: nutrizione suino, acidi grassi a corta e media catena, omega-3, coniugati dell'acido linoleico

KEYWORDS: swine nutrition, short and medium chain fatty acid, omega-3, conjugated linoleic acid

RIASSUNTO: I lipidi, normalmente utilizzati in nutrizione suina, sono costituiti prevalentemente da grassi neutri, in particolare trigliceridi (esteri di acidi grassi e glicerolo). Gli acidi grassi si suddividono in: saturi senza doppi legami, monoinsaturi con presenza di un doppio legame o polinsaturi con più doppi legami sulla catena carboniosa. In nutrizione suina i grassi sono tradizionalmente somministrati attraverso la dieta come alimenti energetici permettendo anche l'apporto di vitamine liposolubili ed acidi grassi essenziali. Inoltre nei grassi l'efficacia di utilizzo dell'energia è molto elevata, con perdite metaboliche minime rispetto ad altri nutrienti. Recentemente l'interesse dei nutrizionisti si è spostato verso l'utilizzo di acidi grassi che presentano effetti specifici a livello fisiologico: gli acidi grassi a corta e media catena con attività antimicrobica ed effetti positivi sul gut health, i coniugati dell'acido linoleico e gli acidi grassi della serie ω-3 con attività antinfiammatoria, immunomodulante e miglioramento della qualità nutrizionale dei prodotti (functional foods).

ABSTRACT: The lipids in feedstuffs commonly fed to pigs consist mainly of neutral fats, specifically triglycerides (ester of fatty acids and glycerol). Fatty acids (FA) may be saturated, containing no double bonds, monounsaturated, featuring one double bond, or polyunsaturated, with multiple double bonds. In swine nutrition fats are traditionally introduced in diets as high energy constituent. Moreover they also supply liposoluble vitamins and essential fatty acids. In addition, the efficiency of the use of metabolizable energy from lipids is very high, with a minimum heat increment compared to other nutrients. Recently, the interest of nutritionists pointed to specific fatty acids for some particular physiological effects: gut heath and anti-microbial activity, anti-inflammatory and immunomodulatory activity and functional food design. The fatty acids that have these physiological effects are: short and medium chain FA acid, omega-3 and conjugated linoleic acid.

INTRODUZIONE

In nutrizione suina i lipidi alimentari (oli e grassi) sono tradizionalmente inseriti nella dieta per l'alta concentrazione energetica e l'elevata appetibilità. I lipidi, oltre ad essere alimenti energetici, sono veicolo delle vitamine liposolubili, ed apportano acidi grassi essenziali (EFA). Inoltre nei grassi l'efficacia di utilizzo dell'energia è molto elevata (Figura 1), con

perdite metaboliche (heat increment) minime rispetto ad altri nutrienti e questo comporta una riduzione dello stress causato da temperatura elevata durante i mesi estivi (Noblet et al., 1994).
I lipidi utilizzati sono costituiti prevalentemente da grassi neutri, in particolare trigliceridi (esteri di acidi grassi e glicerolo). La parte variabile dei lipidi sono quindi gli acidi grassi che possono differire per: lunghezza della catena carboniosa, tipo di legame e posizione spaziale del doppio legame. Gli acidi grassi possono essere classificati in saturi (SFA), senza doppi legami, monoinsaturi (MUFA), con un solo doppio legame, e polinsaturi (PUFA) con presenza di due o più doppi legami (Agostini et al., 1992). L'importanza nutrizionale dei lipidi alimentari si esprime attraverso l'apporto quantitativo e qualitativo degli acidi grassi. Dal punto di vista qualitativo risulta determinante per le caratteristiche strutturali e funzionali dei lipidi la composizione acidica, cioè il contenuto in SFA, MUFA e PUFA. La presenza dei doppi legami, la lunghezza della catena carboniosa, l'isomeria di posizione e geometrica condizionano le proprietà nutrizionali, fisiche e biologiche dei lipidi.
I SFA hanno prevalentemente significato energetico mentre i PUFA hanno importanti ruoli strutturali e metabolici, per lo svolgimento dei quali è necessaria l'assunzione degli acidi grassi essenziali (EFA). Chimicamente gli EFA comprendono acidi grassi polinsaturi a 18 o più atomi di carbonio, aventi il primo doppio legame in posizione 3 o 6 a partire dal gruppo metilico della catena carboniosa (ω-3 o ω-6). I capostipiti della serie ω-3 ed ω-6 sono l'acido linoleico (C18:2 ω-6) e l'acido α linolenico (C18:3 ω-3) (Rooke et al. 2003).
Recentemente è cresciuto l'interesse dei nutrizionisti verso l'utilizzo di acidi grassi con specifici effetti a livello fisiologico: gut health ed attività antimicrobica, attività antinfiammatoria ed immunomodulante e functional food design. Gli acidi grassi con queste caratteristiche sono:
acidi grassi a corta (SCFA) e media catena (MCFA)
acidi grassi della serie ω-3
coniugati dell'acido linoleico (CLA)

Acidi grassi a corta (SCFA) e media catena (MCFA)
Gli acidi grassi che possiedono una catena carboniosa in cui si contano meno di sei atomi di carbonio; vengono definiti a corta catena (SCFA, acronimo di "Short Chain Fatty Acids"), e sono l'acido acetico, propionico, butirrico e valerico. Gli acidi grassi a media catena (medium chain fatty acids, MCFA) presentano da 6 a 12 atomi di carbonio e sono l'acido caproico, caprilico, caprico e laurico. Questi acidi grassi vengono prodotti principalmente durante la fermentazione dei polisaccaridi non amilacei operata da batteri a livello di intestino crasso (Pluske et al., 1999). I principali SCFA e MCFA sono riportati in tabella 1.
Gli SCFA e MCFA presentano numerose proprietà a livello di:
metabolismo cellulare e mantenimento del "gut health" (Defoirdt et al., 2009).
Normalmente gli enterociti a livello di colon ricavano il 60-70% del loro fabbisogno energetico dai SCFA, in particolare dal butirrato (Scheppach et al. 1992), che presenta anche azione di prevenzione della colite ulcerosa. Inoltre è stato osservato come il butirrato ed il propionato siano indispensabili nel mantenimento del normale metabolismo della mucosa intestinale (Kruh et al. 1994), regolando crescita e proliferazione cellulare (Treem et al., 1994). Infatti sono riportati effetti positivi del butirrato sulla profondità delle cripte a livello di cieco e sulla lunghezza dei villi a livello di ileo (Piva et al., 2002).

microflora intestinale (Boyen et al., 2008)
Gli acidi grassi a corta e media catena sono in grado di inibire la crescita di batteri patogeni (*Escherichia coli, Salmonella* spp) abbassando il pH a livello intestinale e creando quindi un ambiente favorevole per lattobacilli e bifidus (Blomberg et al., 1993). Diminuiscono inoltre il livello di colonizzazione ad opera della *Salmonella* Typhimurium a livello di cellule della muscosa intestinale (Figura 2).
L'azione antibatterica si esplica anche mediante la loro capacità di attraversare la parete batterica in forma indissociata e dissociarsi all'interno della cellula provocando un accumulo di ioni H+ che porta alla morte cellulare (Ricke et al., 2003).
sistema immunitario (Weber et al., 2006a)
L'effetto antinfiammatorio del butirrato si esplica attraverso una minor produzione sia sistemica, che in loco di citochine proinfiammatorie.

Un numero sempre maggiore di pubblicazioni scientifiche supporta la tesi che la gamma degli effetti fisiologici dei SCFA e MCFA, che si esplicano prevalentemente a livello di mucosa intestinale, siano in grado di migliorare l'assorbimento di nutrienti e di conseguenza la salute e le performance degli animali. Questo diventa evidente soprattutto in momenti critici come lo svezzamento, durante il quale l'animale è sottoposto a forte stress dovuto principalmente al brusco passaggio da una dieta prevalentemente lattea a una dieta solida. In questa fase la difficoltà di adattamento si traduce in una ridotta ingestione di alimento accompagnata da un'atrofia dei villi ed iperplasia delle cripte con un'alterazione del ricambio dell'epitelio intestinale. Questo causa un minor assorbimento di nutrienti, scarso accrescimento ed un elevata insorgenza di patologie intestinali. In tali condizioni inoltre si osserva un'alterazione nell'equilibrio della microflora intestinale con diminuzione dei *Lattobacilli* ed aumento di batteri opportunisti quali *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (Pluske et al.1999).
Numerose ricerche hanno evidenziato che la somministrazione di SCFA e di MCFA nell'alimentazione del suinetto in svezzamento permette un aumento dell'efficienza alimentare (Manzanilla et al., 2006) e dell'accrescimento ponderale (Kotunia et al., 2004).

Acidi grassi della serie omega 3
Esistono due importanti serie di acidi grassi essenziali (EFA) che contengono, rispettivamente, il loro primo doppio legame in posizione 3 e 6: quelli che derivano dall'acido linoleico (LA; C18:2 ω-6) e gli acidi grassi che derivano dall'acido α–linolenico (ALA; C18:3 ω-3) (Rooke et al. 2003). Gli acidi grassi a 18 atomi di carbonio (LA e ALA) si comportano da precursori essenziali degli altri acidi grassi a catena più lunga, rispettivamente per la serie ω-6 e ω-3 (Tran et al. 2003).
Gli acidi grassi della serie ω-3, con l'eccezione dell'ALA presente in elevati quantitativi nel seme di lino ed in percentuali inferiori nell'olio di colza e di soia, sono principalmente di origine marina e fra questi in particolare l'acido eicosopentaenoico (EPA, C20:5 ω-3), e l'acido docosoesaenoico (DHA, C22:6 ω-3), contenuti in alcuni tipi di alghe e nei pesci.
Gli acidi grassi della serie ω-6 sono invece di origine terrestre (contenuti in particolare negli oli vegetali).
Nelle diete per suini il rapporto tra PUFA delle serie ω-6 e ω-3 si attesta intorno a 12:1, poichè la razione è costituita prevalentemente da cereali e materie prime proteiche, ricche in ω-6 (Wilfart et al. 2004).

Le attività biologiche dei PUFA ω-3 sono molteplici: effetti antiaterogenici, antitrombotici, anticancerogeni, antinfiammatori e miglioramento della funzionalità cardiaca e vascolare (Simopoulos 2009).

Nell'ambito dell'alimentazione suina, gli effetti dei PUFA ω-3 di maggior interesse sono:

modulazione della risposta infiammatoria (Calder 2007)

I PUFA delle serie ω-6 e ω-3 competono per lo stesso sistema enzimatico (elongasi e denaturasi) e di conseguenza un aumento degli ω-3 comporta una riduzione degli acidi grassi a lunga catena della serie ω-6, tra cui l'acido arachidonico (AA; C20:4 ω-6). L' AA è il substrato per la sintesi delle prostaglandine della serie 2 (PGE_2), coinvolte nella modulazione dell'intensità e della durata della risposta infiammatoria e immunitaria (Calder, 2007). La PGE_2 ha diversi effetti pro-infiammatori, e regola la produzione di citochine da parte di monociti, macrofagi e linfociti (Bagga et al., 2003). Anche i PUFA ω-3, e in particolare l'EPA, sono substrati per la biosintesi di prostaglandine, ma della serie 3, biologicamente meno attive di quelle della serie 2 (PGE_2).

La quantità ed il tipo di eicosanoidi sintetizzati dipende quindi da diversi fattori; cruciale risulta la disponibilità dell'AA che può variare a seconda della presenza, tra i fosfolipidi di membrana, di altri acidi grassi insaturi potenzialmente in competizione (Dinarello, 1999). Aumentando quindi la quota di ω-3 nella dieta si ha una riduzione di AA nelle membrane cellulari ed una riduzione di PGE_2 (Boyce 2007).

La modulazione della risposta infiammatoria è legata anche alla capacita dei PUFA ω-3 di attivare l'espressione genica di uno o più fattori di trascrizione quali il recettore per gli attivatori dei perossisomi gamma (PPARγ). Il PPARγ è un membro dei recettori nucleari steroidei ed e' in grado di regolare la trascrizione di svariati geni. Il trattamento con i ligandi del PPARγ inibisce la produzione di molecole pro-infiammatorie quali il tumor necrosis factor (TNFα) e l'interleuchina 6 (IL-6). Zhan et al. (2009) riporta che, l'integrazione della dieta con il 10% di semi di lino in suini per 3 mesi, permette un aumento dell'espressione genica del PPARγ ed una diminuzione dell'espressione genica di TNFα e IL-6 a livello muscolare (Figura 3).

L'inclusione di PUFA ω-3 nella dieta permette quindi di modulare il sistema immunitario, diminuendo i processi catabolici dovuti alla risposta infiammatoria, migliorando la salute ed il benessere animale.

miglioramento delle performance riproduttive (Mateo et al., 2009; Rooke et al., 2001b)

Numerosi studi hanno evidenziato un miglioramento delle performance riproduttive nelle scrofe alimentate con ω-3. Mateo et al. (2009) riportano che i suinetti, allattati da scrofe alimentate con mangime integrato con ω-3, presentano un peso più elevato allo svezzamento. Inoltre nello stesso studio si evidenzia un aumento delle immunoglobuline di classe G (IgG) nel colostro delle scrofe che hanno ricevuto la miscela di ω-3. Rooke et al. (2001a) riportano una riduzione della percentuale di mortalità dei suinetti in pre-svezzamento, nati da scrofe alimentate con olio di salmone durante la gestazione.

Inoltre la somministrazione di ω-3 ai verri ha un' influenza positiva sulla fertilità e sulla qualità del materiale seminale, che include concentrazione, percentuale di spermatozoi vitali e morfologia (% di spermatozoi con acrosoma normale) (Rooke et al., 2001b).

I PUFA della serie ω-3 influenzano positivamente alcuni aspetti della fase riproduttiva nelle scrofe e nei verri. Ulteriori approfondimenti sono tuttavia necessari per determinare il corretto momento fisiologico, la durata della somministrazione, la fonte, ed il quantitativo

corretto di PUFA ω-3.
miglioramento della qualità nutrizionale dei prodotti (functional foods).
Le diete occidentali sono povere in PUFA, in particolare in ω-3, in quanto si ha un'insufficiente assunzione con la dieta e/o squilibri tra PUFA ω-6 ed ω-3 e ciò può essere una concausa dell'instaurarsi di numerose malattie tra cui quelle cardiovascolari, autoimmuni e processi infiammatori cronici (Simopoulos, 2009). Infatti il rapporto tra PUFA ω-6 ed ω-3 nelle diete dei paesi occidentali è sbilanciato a favore dei primi e varia da circa 10:1 fino al 15:1 ed è ben lontano dai valori raccomandati di almeno 5:1 (ISSFAL 2004). Considerata la limitata disponibilità di alimenti in grado di apportare ω-3 nell'alimentazione convenzionale, e la necessità di avere diete con un più alto contenuto in ω-3 ed un corretto rapporto ω-6 ed ω-3, l'attenzione si è focalizzata sull'importanza che la carne suina può avere come alimento funzionale in grado di offrire un beneficio in più per la salute rispetto a quelli tradizionali (functional foods) (Coates et al, 2009). Bisogna però tener presente che le caratteristiche tecnologiche e sensoriali della carne suina e dei prodotti trasformati sono influenzate dalla composizione in acidi grassi del tessuto adiposo. In particolare l'aumento del contenuto di PUFA ω-3 può portare ad un peggioramento delle caratteristiche sensoriali soprattutto nei prodotti trasformati a lunga stagionatura, a causa della loro elevata suscettibilità all'ossidazione (Cannata et al., 2009).
La principale fonte alimentare per suini, contenente un elevato quantitativo di ω-3 a lunga catena (EPA e DHA), è rappresentata da farine e oli di pesce, che, oltre ad avere un costo molto elevato, soprattutto se deodorizzati, aumentano la suscettibilità all'ossidazione e l'alterazione delle caratteristiche sensoriali della carne e prodotti derivati (Wood et al., 1999). Il lino è una valida alternativa per arricchire la carne suina di ω-3, anche se l'ALA viene convertito soprattutto in EPA e solo limitatamente in DHA (Riley et al., 2000). Inoltre l'ALA contenuto nella colza e nel lino è meno suscettibile all'ossidazione, comparato all'EPA e al DHA, rendendolo più facilmente conservabile.
L'alimentazione prolungata con dieta grassata con olio di colza, che presenta un discreto contenuto in acido linolenico, porta ad un lieve aumento del contenuto di questo a livello di muscolo *Longissimus Dorsi* e di prodotto trasformato (Corino et al., 2002c; Pastorelli et al., 2003). Corino et al. (2008a) e Musella et al. (2009) riportano un aumento significativo del contenuto in ALA ed EPA ed una riduzione del rapporto tra ω-6 ed ω-3 sia nella carne fresca (*Longissimus Dorsi*) che nel prodotto trasformato (prosciutto crudo tipo Parma), ottenuti da suini alimentati con il con 5% di semi di lino (Figura 4). Considerato l'elevato consumo di carne suina, che si attesta su 43,4 kg pro capite/anno (Eurostat 2007), un aumento del contenuto di ω-3 in carni e salumi permetterebbe un incremento significativo di ω-3 nella dieta convenzionale. L'utilizzo di alimenti in grado di apportare ω-3 nella dieta suina, permette un aumento del contenuto di questi nelle carni suine e nei prodotti trasformati, includendoli nella categoria dei functional food.

Coniugati dell'acido linoleico (CLA)
Con il termine di coniugati dell'acido linoleico (CLA) si indicano tutte le configurazioni dell'acido linoleico, i cui doppi legami non sono separati da alcun gruppo metilico e di conseguenza risultano coniugati. Nei prodotti naturali i doppi legami coniugati sono compresi tra 6,8-C18:2 e 12,14-C18:2, con configurazione *cis-cis, trans-trans, cis-trans e trans-cis* (Sehat et al., 1998). L'origine naturale dei CLA è data da una isomerizzazione

dell'acido linoleico, introdotto con la dieta, da parte di un enzima prodotto dal batterio *Butivibrio fibrosolvens* durante il processo di bioidrogenazione a livello ruminale con formazione prevalente dell'isomero *cis*-9, *trans*-11 CLA (Kepler et al., 1966). Le fonti alimentari di isomeri CLA, in prevalenza *cis-9, trans-11* CLA, sono quindi rappresentati da carni di ruminanti, latte, formaggi e prodotti derivati (Chin et al., 1992). La maggior parte dei prodotti contenenti CLA ed utilizzati come integratori alimentari derivano da idrogenazione industriale e contengono dal 60 al 90% di isomeri CLA (acidi grassi liberi o trigliceridi) in prevalenza *cis-9, trans-11* CLA ed il trans-*10, cis-12* CLA (Larsen et al., 2003).
Negli ultimi anni l'interesse nei confronti di questi composti è notevolmente cresciuto, motivato dalle innumerevoli proprietà che i due isomeri CLA possiedono che vengono sintetizzate in Tabella 2 (Belury, 2002; Pariza, 2004).
In alimentazione suina, gli effetti dei CLA di maggior interesse sono:
effetti sulle performance di crescita (Corino et al., 2006)
Gli effetti dei CLA sulle performance di crescita degli suini sono controverse (Dugan et al., 2004; Corino et al., 2006). Thiel-Cooper et al. (1998) hanno riportato un incremento dell'accrescimento medio giornaliero con livelli crescenti di CLA, da 0.12% a 1% nella dieta. Ostrowska et al. (1999) hanno evidenziato un miglioramento dell'indice di conversione alimentare con la somministrazione di livelli crescenti di CLA in suini in accrescimento. In contrasto con gli studi precedenti, Dugan et al. (1997) non riscontrano effetti positivi della somministrazione del 2% di CLA nella dieta di suini da 61.5 kg a 106 kg di peso vivo sulle performance di crescita. Un analisi degli studi condotti sui suini (2001-2009), con assunzione di CLA compresa tra 3,7 e 34 g/giorno, evidenzia come vi sia una diminuzione dell'indice di conversione alimentare, compresa tra lo 0,7% e il 14% (unpublished data).
influenza su metabolismo lipidico (Domeneghini et al., 2006)
I CLA presentano un azione anti-adipogenica che si esplica attraverso la riduzione della lipogenesi e l'aumento della lipolisi. I CLA diminuiscono l'attività della dell'Acetil Co-A Carbossilasi, enzima chiave nella sintesi degli acidi grassi, come osservato nel tessuto adiposo di suini alimentati con lo 0,5% di CLA dai 97 kg ai 172 kg di peso vivo (Corino et al., 2003). La diminuzione dell'adipogenesi è dovuta anche ad una diminuzione dell'attività della lipoproteinlipasi (LPL), la cui funzione è la captazione degli acidi grassi dalle lipoproteine plasmatiche e il loro utilizzo da parte degli adipociti. I CLA inoltre aumentano l'attività della carnitinapalmitoiltransferasi (CPT), enzima promotore del metabolismo ossidativo degli acidi grassi, sia nel muscolo che nei lipidi di deposito.
I CLA hanno azione diretta sulla proliferazione dei preadipociti e sull'apoptosi degli adipociti. Nel tessuto adiposo di suini pesanti, alimentati con lo 0,75% di CLA, si è osservato una diminuzione della proliferazione dei preadipociti ed un aumento dell'apoptosi degli adipociti (Corino et al., 2005; Di Giancamillo et al.,2007)
A livello di composizione acidica del tessuto adiposo i CLA diminuiscono l'azione dell'enzima stearoil-CoA desaturasi (SCD), che catalizza la conversione degli SFA in MUFA, convertendo l'acido palmitico e stearico in acido palmitoleico ed oleico. A seguito della somministrazione con CLA si osserva quindi un aumento della saturazione del tessuto adiposo, come osservato nel grasso di copertura di prosciutti provenienti da suini alimentati con CLA (Corino et al., 2003). Inoltre in una nostra recentissima pubblicazione su Journal of Nutrition si evidenzia come l'azione antiadipogenica dei CLA sia legata anche ad una diminuzione della leptina a livello di tessuto adiposo. Inoltre si evidenzia anche

un coinvolgimento del sistema noradrenergico, da cui si evince che i CLA aumentano un rilascio di catecolamine (Di Giancamillo et al., 2009).
L'azione dei CLA sul metabolismo lipidico, comprende molteplici meccanismi a livello cellulare non ancora delucidati, che sono oggetto di nuovi studi ed approfondimenti.
modulazione del sistema immunitario (Corino et al., 2009)
A livello di sistema immunitario i CLA presentano proprietà immuno-modulatorie e antinfiammatorie. L'azione immunomodulatoria dei CLA si esplica attraverso un aumento delle IgG, IgA ed IgM, ed una diminuzione delle IgE e del TNFα, citochina coinvolta nella infiammazione sistemica. Inoltre i CLA agiscono anche potenziando l'immunità non specifica, attraverso l'aumento di lisozima sierico. L'aumento della concentrazione sierica di lisozima ed IgG è stato evidenziato in suinetti in post svezzamento alimentati con lo 0,5% di CLA (Corino et al., 2002a). L'azione immunomodulatoria dei CLA viene confermata in scrofe alimentate con lo 0,5% di CLA da 7 giorni prima del parto e nei suinetti sia durante la lattazione, sia nel post svezzamento con dieta integrata con CLA (Bontempo et al., 2004; Corino et al., 2009).
L'azione antinfiammatoria è legata alla capacità dei CLA di essere allungati e desaturati a 20:4 isomeri che possono competere con l'acido arachidonico per l'enzima ciclossigenasi con bassa produzione di PGE_2, in modo analogo all'azione dei PUFA ω-3 (Turek et al., 1998).
In un recente studio in suinetti in post svezzamento si è osservato che la somministrazione di CLA ha portato ad una aumento della popolazione linfocitaria dei CD8+, riducendo la produzione delle PGE_2 (Lai et al., 2005).
L'inclusione di CLA nella dieta permette, attraverso azione immunomodulatoria e antinfiammatoria di ridurre i processi catabolici dovuti alla risposta infiammatoria, migliorando le condizioni sanitarie e il benessere animale.

miglioramento della qualità tecnologica e nutrizionale dei prodotti (functional foods)
Tra le numerose attività biologiche, i CLA influenzano la composizione in acidi grassi del tessuto adiposo, portando ad un aumento dei SFA a scapito dei MUFA. Questa azione, più marcata a livello di tessuto adiposo, risulta positiva in quanto aumenta la stabilità del tessuto, e migliora l'attitudine alla trasformazione.
Le normative che disciplinano il circuito del prosciutto crudo di Parma valutano, come indicatore della qualità del grasso di copertura della coscia, il numero di iodio. Il valore deve essere inferiore a 70 per evitare che vi siano problemi durante i processi di trasformazione (soft fat).
In suini alimentati con lo 0,25% e lo 0,5% CLA, dai 97 kg ai 170 kg di peso vivo, si è osservata una riduzione del numero di iodio del 9,1% e 6,8% rispetto al controllo (Corino et al., 2003). Lo stesso risultato (- 6,7%) è stato osservato in una prova successiva in cui i suini sono stati alimentati con lo 0,75% di CLA per 3 mesi (Corino et al., 2005) Risultati analoghi sono stati osservati in suini macellati a pesi inferiori (Figura 5).
L'attività dei CLA sulla composizione acidica del tessuto adiposo migliora anche la stabilità verso i fenomeni ossidativi e la shelf life del prodotto (Corino et al 2002b; Corino et al., 2003). Attraverso l'integrazione con CLA si è potuto infatti osservare una maggior stabilità ossidativa del muscolo *Longissimus Dorsi* di suini pesanti alimentati con lo 0,5% di CLA dai 97 ai 170 kg di peso vivo.
La somministrazione di CLA permette inoltre un aumento del contenuto dei due isomeri a

livello di tessuto muscolare ed adiposo, migliorando la qualità nutrizionale dei prodotti. Pastorelli et al., (2005) riporta un aumento significativo di *cis-9, trans-11* CLA (+75%) e di *trans-10, cis-12* CLA (+85%) nel muscolo *Longissum Dorsi* di suini alimentati con lo 0,25% e lo 0,5% di CLA. Questo si evidenzia anche nel prosciutto crudo di Parma di suini alimentati con lo 0,25% di CLA (Lo Fiego et al., 2005). Tale aumento risulta più marcato a livello di grasso (0,95 vs 5,22 mg/g lipidi *cis-9, trans-11* CLA) rispetto al muscolo *Biceps Femoris* (0,75 vs 1,74 mg/g lipidi *cis-9, trans-11* CLA) (Figura 6).
Un aumento dell'assunzione di CLA attraverso le carni suine ed i salumi potrebbe comportare effetti positivi sulla salute del consumatore con un minor rischio di sviluppare alcune patologie quali tumori e malattie cardiovascolari.

CONCLUSIONI

Le specifiche attività biologiche degli acidi grassi menzionati possono risultare interessanti per operare sulle problematiche legate alle differenti fasi produttive dell'allevamento suino.
L'attività antimicrobica e di "gut health" degli SCFA e MCFA risulta essere interessante nella fase di svezzamento dei suinetti, durante il quale l'animale è sottoposto a forte stress dovuto principalmente al brusco passaggio da una dieta lattea a una dieta solida, con alterazione nell'equilibrio della microflora intestinale.
L'azione che gli ω-3 e i CLA compiono a livello di sistema immunitario permette un miglioramento delle condizioni sanitarie degli animali, favorevole sia nei riproduttori sia nei suinetti in svezzamento. L'integrazione della dieta con CLA potenzia il sistema immunitario nelle scrofe in lattazione e nei suinetti sotto scrofa e in post svezzamento, modulando la produzione di immunoglobuline e lisozima. La somministrazione di ω-3 ha un' influenza positiva sulla fertilità e sulla qualità del materiale seminale nei verri e porta ad un miglioramento delle performance riproduttive nelle scrofe. Le migliori proprietà nutrizionali delle carni e dei prodotti trasformati in suini alimentati con ω3 e CLA rende interessante l'utilizzo di questi acidi grassi nel suino nelle fase di ingrasso. In questa ottica la carne suina potrebbe porsi come alimento funzionale in grado di offrire un beneficio in più per la salute rispetto a quelli tradizionali (functional foods).
Esistono però alcune problematiche ed accorgimenti legati all'integrazione di tali i acidi grassi nelle diete per suini:
- L'appetibilità dei SCFA e MCFA non risulta particolarmente elevata per problemi legati alla presenza di odori, con necessità di opportuni trattamenti tecnologici (es. protezione).
- L'inclusione nelle diete con ω-3 ne rende necessaria la protezione dai fenomeni ossidativi, con un maggior impiego di antiossidanti nelle dieta. Inoltre si può avere un peggioramento delle caratteristiche sensoriali soprattutto nei prodotti trasformati a lunga stagionatura, a causa della elevata suscettibilità all'ossidazione degli ω-3.
- L'impiego delle miscele commerciali di CLA, che contengono i due isomeri *cis-9, trans-11* CLA ed il *trans-10, cis-12* CLA in un rapporto di circa 1:1, aumenta la concentrazione anche dell'isomero *trans-10, cis-12* CLA nelle carni e nei trasformati. Si pone quindi la problematica legata alle quantità molto limitate di tale isomero in natura (carni e latte di ruminanti).

Table 1. Main short chain (SCFA) and medium chain (MCFA) fatty acid
Tabella 1. Principali acidi grassi a corta (SCFA) e media (MCFA) catena

Acidi grassi a corta catena *Short chain fatty acid*		Acidi grassi a media catena *Medium chain fatty acid*	
Nome *Name*	Atomi di C *C Atoms*	Nome *Name*	Atomi di C *C Atoms*
Acido acetico *Acetic Acid*	2	Acido caproico *Caproic Acid*	6
Acido propionico *Propionic acid*	3	Acido caprilico *Caprilic Acid*	8
Acido butirrico *Butyric Acid*	4	Acido caprico *Capric Acid*	10
Acido valerico *Valeric Acid*	5	Acido laurico *Lauric acid*	12

Table 2. Main biological activities of conjugated linoleic acid (CLA)
Tabella 2. Principali proprietà biologiche dei CLA

Principali proprietà biologiche dei CLA *CLA main biological activities*	
Effetti sulle performance di crescita *Effects on growth performance*	(Bee 2001 - Corino et al., 2003)
Effetto anabolizzante *Anabolic effect*	(Pariza et al., 1996 - Houseknecht et al., 1998)
Effetti sul tessuto osseo *Effects on bone tissue*	(Seifert et Watkins 1997)
Riduzione aterosclerosi *Reduction of atherosclerosis*	(Corino et al.,2002b - Park et al., 1997)
Influenza sul metabolismo lipidico *Influence on lipid metabolism*	(Mersmann 2001 - Corino et al., 2006)
Modulazione del sistema immunitario *Immunomodulation activity*	(Cook et al., 1993 - Corino et al., 2009)
Attività anticancerogena *Anticancerogenic activity*	(Ha et al., 1990 - Sugano et al., 1997)

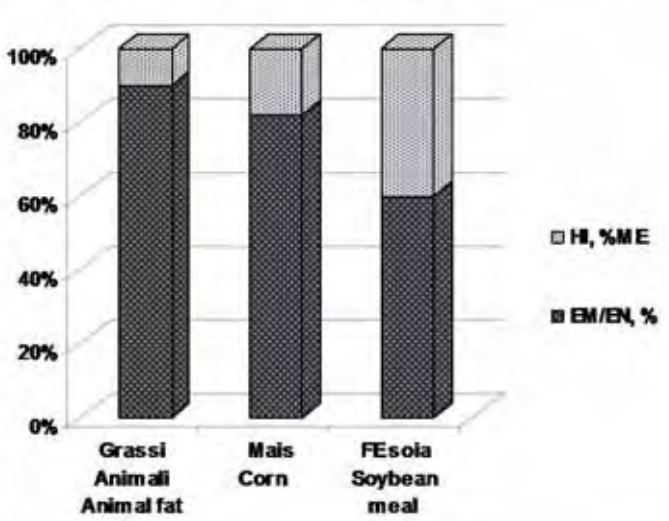


Figura 1. Efficacia di utilizzo dell'energia e perdite metaboliche (heat increment, HI) in diversi alimenti (Noblet et al., 1994).
Figure 1. Efficiency of the use of metabolizable energy (ME) and heat increment (HI) of animal fat, corn and soybean meal. (Noblet et al., 1994).

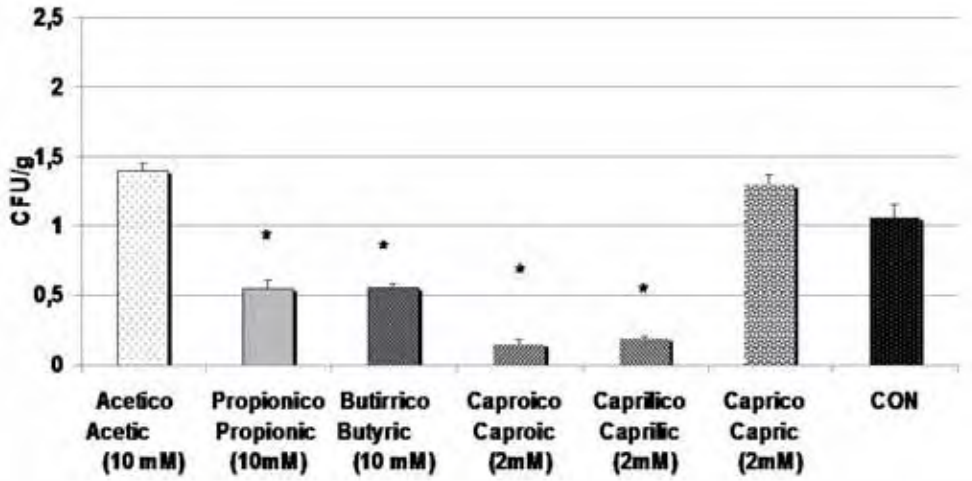


Figura 2. Capacità degli acidi grassi a corta e media catena di inibire la colonizzazione *Salmonella* Typhimurium a livello di cellule della muscosa intestinale (Boyen et al., 2008).
Figure 2. Short chain and medium chain fatty acid ability in inhibiting *Salmonella* Typhimurium colonization of intestinal muscosal cells (Boyen et al., 2008).

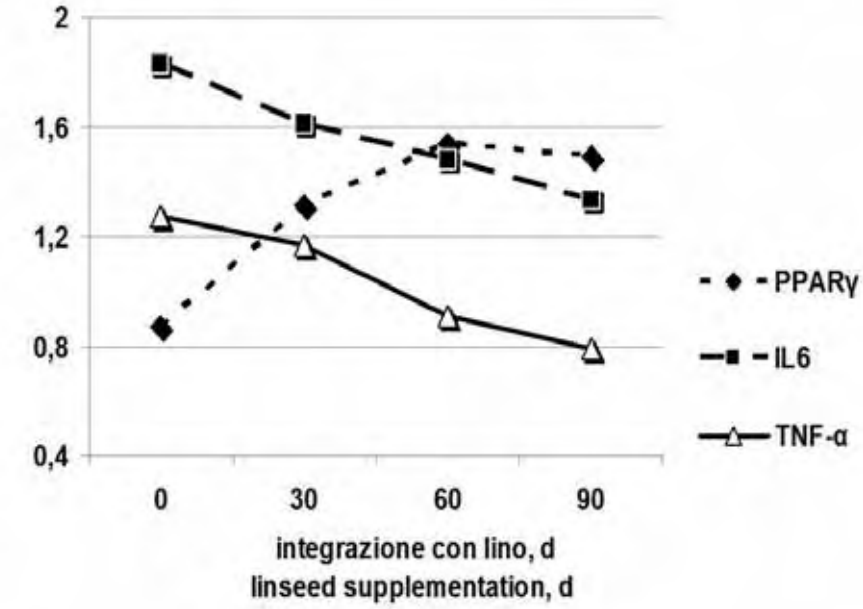


Figura 3. Effetto dell'integrazione della dieta con lino sull'espressione genica del PPARγ e sulla di TNFα e IL-6 a livello muscolare
Figure 3. Effect of pig dietary supplementation with linseed on muscular PPARγ, TNFα and IL-6 gene expression(Zhan et al., 2009).

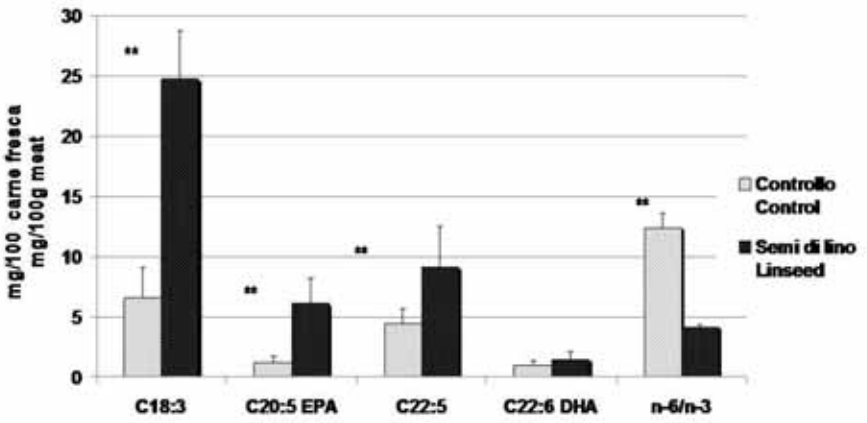


Figura 4. Quantità di PUFA ω-3 nel muscolo LD di suini alimentati con dieta controllo o integrata con il 5% di semi di lino (Corino et al., 2008).
Figure 4. Loin ω-3 PUFA content in heavy pigs fed control or 5% linseed diet (Corino et al., 2008).

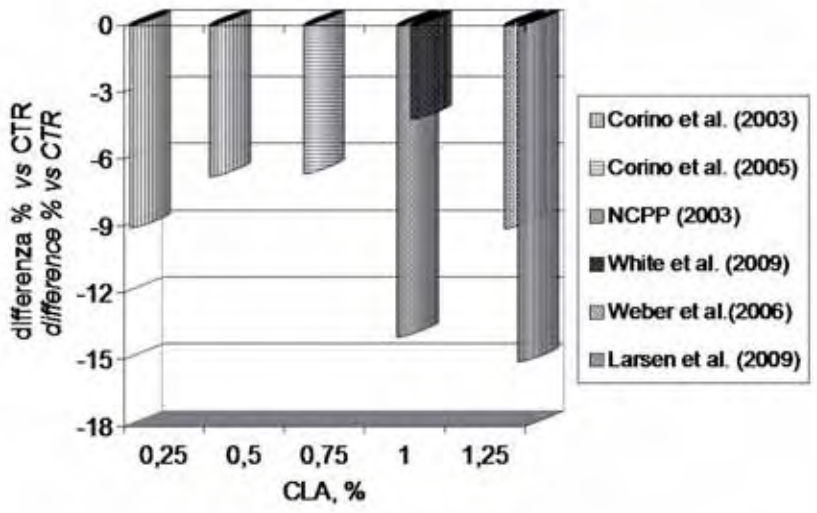


Figura 5. Riduzione del numero di iodio del tessuto adiposo sottocutaneo a seguito di somministrazione di CLA.
Figure 5. Reduction of the adipose tissue Iodine number in pigs fed CLA.

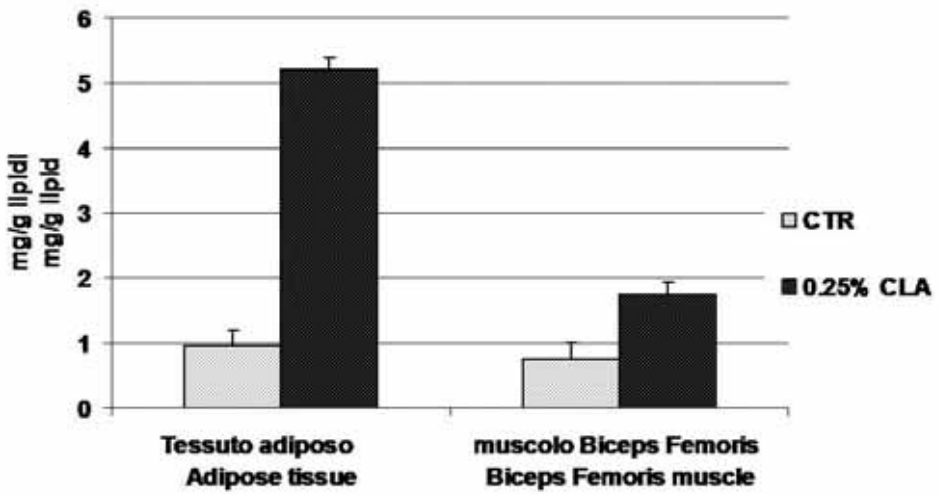


Figura 6. Contenuto in *cis-9, trans-11* CLA nel tessuto adiposo e muscolare del prosciutto crudo di Parma di suini alimentati con dieta controllo o integrata con lo 0,25% di CLA (Lo Fiego et al., 2005).
Figure 6. Effect of 0.25% dietary CLA supplementation on C*is-9, trans-11* CLA content of subcutaneous adipose tissue and BF muscle of seasoned Parma ham (Lo Fiego et al., 2005).

Bibliografia

Agostini, C., Bruzzese, M.G. (1992). "Gli acidi grassi: classificazione biochimica e funzionale." Ped. Med. Chir. 14, 473-479.

Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J.A., Reddy S. T. (2003) "Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100, 1751–1756.

Bee, G. (2001) "Dietary conjugated linoleic acid affect tissue lipid composition but not de novo lipogenesis in finishing pigs." Anim. Res. 50, 383–399.

Belury, M.A. (2002) "Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action." Ann Rev. 22, 505–524.

Boyce JA. (2007) "Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation." Immunol Rev. 217, 168-185.

Boyen F., Haesebrouck F., Vanparys A., Volf J., Mahu M., Van Immerseel F., Rychlik I., Dewulf J., Ducatelle R., Pasmans F. (2008) "Coated fatty acids alter virulence properties of Salmonella Typhimuriumand decrease intestinal colonization of pigs." Vet. Microbiol. *132,* 319-327.

Blomberg L., Henriksson A., Conway P.L. (1993) "Inhibition of adhesion of Escherichia coli K88 to piglet ileal mucus by Lactobacillus spp." Appl. Environ. Microbiol. 59:34-39.

Bontempo V., Sciannimanico D., Pastorelli G., Rossi R., Rosi F., Corino C. (2004) "Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sow and piglets." J. Nutr. 134, 817-824.

Calder, P.C. (2007) "Immunomodulation by omega-3 fatty acids" Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 77, 327-335.

Cannata S., Meteau K., Mourot J., Corino, C. (2009) "Parma ham enriched in omega-3 fatty acids as functional food: a sensory evaluation by Italian and French panels" IV Gout-Nutrition-Santè Congress, 18th-20th March Dijon.

Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y. L., Pariza M.W. (1992) "Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens."*J. Food Composition and Analysis* 5, 185-197.

Coates A.M., Sioutis S., Buckley J. D., Howe1 P.R.C. (2009) "Regular consumption of n-3 fatty acid-enriched pork modifies cardiovascular risk factors." Brit. J. Nutr. 101, 592–597.

Cook M.E., Miller C.C., Park Y., Pariza M. (1993) "Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression." Poult. Sci. 72, 1301–1305.

Corino C., Bontempo V., Sciannimanico D. (2002a) “Effects of dietary conjugated linoleic acid on some aspecific immune parameters and acute phase protein in weaned piglets”. Can. J. Anim. Sci., 82: 115-117.

Corino C., Mourot J., Magni S., Pastorelli G., Rosi F. (2002b) ”Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits.” J. Anim. Sci. 80, 1020–1028.

Corino C., Magni S., Pagliarini E., Rossi R., Pastorelli G., Chiesa L. M. (2002c) “Effects of dietary fats on meat quality and sensory characteristics of heavy pig loins.” Meat Sci. 60: 1–8.

Corino C., Magni S., Pastorelli G., Rossi R., Mourot J. (2003) “Effect of conjugated linoleic acid on meat quality, lipid metabolism, and sensory characteristics of dry-cured hams from heavy pigs” J. Anim. Sci. 81, 2219-2229.

Corino C., Di Giancamillo A., Rossi R., Domeneghini C. (2005) “Dietary conjugated linoleic acid affects morpho- functional and chemical aspects of subcutaneous adipose tissue in heavy pigs.” J. Nutr. 135, 1444-1450.

Corino C., Pastorelli G., Douard V., Rossi R., Musella M., Mourot J. (2006) “ L’acide linoléique conjugué en nutrition porcine.“ Inra Prod. Anim. 19, 39–46.

Corino C., Musella M., Pastorelli G., Rossi R., Paolone K., Costanza L., Manchisi A., Maiorano G. (2008b). “Influences of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs”. Meat Sci. 79: 307-316.

Corino C., Musella M., Mourot J. (2008a) “Influence of extruded linseed on growth, carcass composition and meat quality of slaughtered pigs at one hundred ten and one hundred sixty kilograms of liveweight”. J. Anim. Sci. 2008, 86:1850-1860.

Corino C., Pastorelli G., Rosi F., Bontempo V., Rossi R. (2009) “Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation in sows on performance and immunoglobulin concentration in piglets.” J. Anim. Sci., 87, 2299-2305.

Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. (2009) “Short-chain fatty acids and poly-β-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production.” Biotechnol. Adv.doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.026

Di Giancamillo A., Vitari F., Cannata S., Domeneghini C., Corino C. (2007) “Conjugated linoleic acids (CLAs) influence leptin expression in the subcutaneous adipose tissue of the heavy pig.” in: Annals of Nutrition and Metabolism “10th European Nutrition Conference on behalf of Federation of the European Nutrition Societies (FENS) and the Union Française pour la Nutrition et l’Alimentation (UFNA) Paris,10-13 july”, 80.

Di Giancamillo A., Rossi R., Vitari F., Pastorelli G., Corino C., Domeneghini C. (2009) "Dietary conjugated linoleic acids decrease leptin in porcine adipose tissue" J. Nutr. doi:10.3945/jn.109.110627

Dinarello, C.A. (1999) "Citokines as endogenous pyrogens." J. Infect. Dis. 179, 294–304.

Domeneghini C., Di Giancamillo A., Corino C. (2006) "Conjugated linoleic acids (CLAs) and white adipose tissue: how both in vitro and in vivo studies tell the story of a relationship" Histol. Histopathol. 21, 663-673.

Dugan M.E.R., Aalhus J.L., Schaefer A.L. Kramer J.K.G. (1997) "The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs." Can. J. Anim. Sci. 77, 723-725.

Dugan M.E.R., Aalhus J. L., Kramer J.K.G. (2004) "Conjugated linoleic acid pork research."Am. J. Clin. Nutr. 79, 1212S-1216S.

Ha Y.L., Storkson J., Pariza M.W. (1990) "Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid" Cancer Res. 50, 1097–1101.

Houseknecht K.L., Vanden Heuvel J.P., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., Belury M.A. (1998)" Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat." Biochem. Biophys. Res. Commun. 244, 678–682.

ISSFAL. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (2004). Global Recommendations. http://www.issfal.org.uk/recommendations-of-others.html

Kepler, C.R., Hirons K.P., McNeill J.J., Tove SB. (1966) "Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by Butyrivibrio fibrisolvens." J Chem. 241:1350–1354.

Kotunia, A., Wolinski J., Laubitz D., Jurkowska M., Rome V., Guilloteau P., Zabielski R. (2004) "Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed by artificial sow." J. Physiol. Pharmacol. 55, 59–68.

Kruh, J., Defer N., TichonkyL. (1994) "Effects of butyrate on cell proliferation and gene expression." In: Cummings J.H., Rombeau J.L., Sakata, T. "Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids" Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 275-288.
Lai C., Yin J., Li D., Zhao L., Chen X. (2005) "Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on performance and immune function of weaned pigs." Arch. Anim. Nutr. 59, 41–51.

Larsen TM, Toubro S, Astrup A (2003) "Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies." J. Lipid Res. 44:2234–2241.

Larsen S.T., Wiegand B.R., Parrish F.C. Jr., Swan J.E., Sparks J.C. (2009)" Dietary conjugated linoleic acid changes belly and bacon quality from pigs fed varied lipid sources" J. Anim. Sci. 87, 285-295.

Lo Fiego D. P., Macchioni P. , Santoro P., Pastorelli G., Corino C.(2005). "Effect of dietary Conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on CLA isomers content and fatty acid composition of dry-cured Parma ham." Meat Sci. 70, 285-291.

Manzanilla E.G., Nofrarias M., Anguita M., Castillo M., Perez J.F.,. Matin-Orue S.M, Kamel C., Gasa J. (2006) "Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs." J. Anim. Sci. 84, 2743–2751.

Mateo R.D., Carroll J.A., Hyun Y., Smith S., Kim S.W. (2009) "Effect of dietary supplementation of omega-3 fatty acids and high levels of dietary protein on performance of sows." J. Anim. Sci. 87, 948-959

Mersmann, H.J. (2001) "Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition." J. Anim. Sci. 80, E126-E134.

Musella M., Cannata S., Rossi R., Mourot J., Baldini P., Corino C. (2009) "Omega-3 pufa from extruded linseed influences fatty acid composition and sensory characteristics of dry-cured ham from heavy pigs." J. Anim. Sci., doi: jas.2008-1355v1-jas.2008-1355.

National Committe for pig production (2003) Annual Report, 21.

Noblet J., Fortune H., Shi X.S., Dubois S. (1994) "Prediction of net energy value of feeds for growing pigs" J. Anim. Sci. 72, 344-354.

Ostrowska E., Morley M., Cross R.F., Bauman D.E., Dunshea F.R. (1999). "Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. " J. Nutr. 129, 2037-2042.

Pariza, M.W, Park, Y., Cook, M., Albright, K., Liu, W. (1996) "Conjugated linoleic acid (CLA) reduces body fat." FASEB J. 10, A3227.

Pariza, M.W. (2004) "Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid." Am. J. Clin. Nutr. 79, 1132S-1136S.

Park Y., Albright K.J., Liu W., Storkson J.M., Cook M.E., Pariza M.W. (1997) "Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice." Lipids 32, 853–858.

Pastorelli G., Magni S., Rossi R., Pagliarini E., Baldini P., Dirinck P., Van Opstaele F., Corino C. (2003) "Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham." Meat Sci. 65: 571-580.

Pastorelli G., Moretti V.M., Macchioni P., Lo Fiego D.P., Santoro P., Panseri S., Rossi R., Corino C. (2005) "Determination of flavour volatile compounds and fatty acid composition of loin muscle of pigs fed conjugated linoleic acid." J. Sci. Food Agric. 85, 2227-2234.

Piva A., Grandini A., Fiorentini L., Morlacchini M., Galvano F., Luchansky J.B. (2002) "Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs." J. Anim. Sci. 80, 670-680.

Pluske J.R., Pethick D.W., Durmic Z., Hampson D.J., Mullan B.P. (1999) "Non-starch polysaccharides in pig diets and their influence on intestinal microflora, digestive physiology and enteric disease" in: Garnsworthy P.C., Wiseman J. "Recent Advances in Animal Nutrition" Nottingham University Press, Nottingham, 189–226.

Ricke C. (2003) "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials" Poult. Sci. 82, 632–639.

Riley P.A., Enser M., Nute G.R., Wood J.D. (2000) "Effects of dietary linseed on nutritional value and other quality aspects of pig muscle and adipose tissue." Anim. Sci. 71, 483–500.

Rooke, J.A., Sinclair A.G., Edwards S.A., Cordoba R., Pkiyach S., Penny P.C., Penny P., Finch A. M., Horgan, G.W. (2001a) "The effect of feeding salmon oil throughout pregnancy on pre-weaning mortality of piglet." Anim. Sci. 73, 489-500.

Rooke J.A., Shao C.C., Speake B.K. (2001b) " Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen." *Reproduction* 121, 315-322.

Rooke J.A., Ferguson E.M., Sinclair A.G., Speake, B.K. (2003). "Fatty acids and reproduction in the pig." In: Garnsworthy P.C., Wiseman J. "Recent advances in animal nutrition" Nottingham University Press, 47-65.

Scheppach W., Sommer H., Kirchner T., Paganelli G.M., Bartram P., Christi S., Richter F., Dusel G., Kasper H. (1992) "Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis." Gastroenterol. 103, 51-56.

Seifert M.F., Watkins B.A. (1997) "Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism." Nutr Res 17, 1209–1228.

Sehat, N., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Mossoba, M.M. Kramer, J.K.G., Ku, Y. (1998) "Silver ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers" Lipids 33, 217–221.

Simopoulos A.P. (2009) "Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects." World Rev. Nutr. Diet. 99, 1-16.

Sugano M., Tsujita A., Yamasaki M., Yamada K., Ikeda I., Kritchevsky D. (1997) "Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats" J. Nutr. Biochem. 8, 38–43.

Thiel-Cooper R.L., Sparks J.C., Wiegand W.R., Parrish Jr F.C., Ewan R.C. (1998). "Conjugated linoleic acid improves performances and body composition in swine." J Anim Sci. 76 (suppl.2): 61.

Tran T.N., Retterstøl K., Christophersen, B.O. (2003) “Metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids in testicular cells.” In: Garnsworthy P.C., Wiseman J. “Recent advances in animal nutrition” Nottingham University Press, 11-22.

Treem W.R., Ahsan N., Shoup M., Hyams J.S. (1994) “Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease.” J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 18, 159-164.

Turek J.J., Li Y., Schoenlein I.A., Allen K.G.D., Watkins B.A. (1998) “Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acid is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio.” J Nutr Biochem 9, 258-266.

Weber T. E., Kerr B. J..(2006a) “Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells.” Vet. Immunol. Immunopathol. 113, 139–147.

Weber T.E., Richert B.T., Belury M.A., Gu Y., Enright K., Schinckel A.P. (2006b) “Evaluation of the effects of dietary fat, conjugated linoleic acid, and ractopamine on growth performance, pork quality, and fatty acid profiles in genetically lean gilts” J Anim Sci 84, 720-732.

White H.M., Richert B.T., Radcliffe J.S., Schinckel A.P., Burgess J.R., Koser S.L., Donkin S.S., Latour M.A. (2009) “Feeding conjugated linoleic acid partially recovers carcass quality in pigs fed dried corn distillers grains with solubles” J Anim Sci. 87, 157-166.

Wilfart A., Ferreira J.., Mounier A., Robin G., Mourot J. (2004). “Effet de différentes teneurs en acides gras n-3 sur les performances de croissance et la qualité nutritionelle de la viande de porc”. Journ. Rech. Porc. France 36, 195-202.

Wood J.D, Enser M., Fisher A. V., Nute G. R., Richardson R.I., Sheard P.R. (1999) “Manipulating meat quality and composition.” Proc. Nutr. Soc. 58, 363-370.

Zhan Z.P., Huang F.R., Luo J., Dai J. J., Yan X.H., Peng J. (2009)“Duration of feeding linseed diet influences expression of inflammation-related genes and growth performance of growing-finishing barrows” J. Anim. Sci. 87, 603-611.

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SIPAS

MICOTOSSINE E MICOTOSSICOSI

Salsomaggiore Terme (PR), 9 ottobre 2009

APPROCCIO PRATICO ALLA GESTIONE DELLE MICOTOSSINE NELL'ALIMENTAZIONE DEL SUINO

FABRIZIO CONTE[1], GIUSEPPE BARICCO[2]

[1]Medico Veterinario, Responsabile Tecnico FA.MA.VIT, Pompiano (BS) (conte@famavit.it)
[2]Medico Veterinario Libero Professionista, Torino (giuseppe@baricco.it)

Vengono definite "*Micotossine*" le sostanze con effetto tossico, sia per gli animali che per l'uomo, prodotte da alcune specie di funghi i quali possono colonizzare sia i raccolti vegetali in campo sia, dopo la raccolta, i prodotti alimentari in magazzino.
Si conoscono più di 300 micotossine ma, ad oggi, solo una trentina sono riconosciute come tossiche. Queste si sviluppano, in determinate condizioni di temperatura e umidità, sui cereali, sui semi di leguminose e sui relativi prodotti e sottoprodotti e derivano per lo più dal metabolismo secondario di funghi del genere *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium*.
Alcuni di questi funghi, in particolare quelli appartenenti al genere *Fusarium*, possono parassitare i cereali dal momento della semina al momento del raccolto in pieno campo, mentre i miceti appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus* possono svilupparsi e produrre micotossine per lo più dal momento della raccolta fino all'immagazzinamento e stoccaggio dei cereali e anche dei mangimi finiti.
Questi differenti momenti di moltiplicazione dei miceti ci possono aiutare a mettere in atto le migliori forme di prevenzione: infatti se la presenza visibile di prodotti ammuffiti è sempre un indice del deterioramento della qualità dei cereali e di possibile presenza di micotossine, l'assenza visibile di muffe non ne garantisce la mancanza perché purtroppo le micotossine sono invisibili.

Foto 1:Grani contaminati
In questo caso la presenza di micotossine è altamente PROBABILE

Foto 2:Grani sani
In questo caso la presenza di micotossine è POSSIBILE

Nella tabella che segue si riportano i principali contaminanti delle materie prime utilizzate nell'alimentazione del suino con le rispettive classi di micotossine prodotte.

Tabella 1. CONTAMINAZIONI

Genere Fusarium	Micotossine	Alimenti contaminati
F. Graminearum, *F. Culmorum, F. Poae,* *F. Sporotrichioides,*	Tricoteceni: deossinivalenolo(DON), nivalenolo(NIV), diacetossiscirpenolo(DAS), tossina T-2, HT-2 Zearalenone	Mais , frumento e altri cereali
F.Moniliforme, *F. Proliferatum*	Fumonisine	Mais
Genere Penicillium		
P. Verrucosum	Ocratossina A	Orzo, mais, frumento e altri cereali
Genere Aspergillus		
A. Flavus	Aflatossina B1 e B2	Mais, altri cereali, semi di soia e arachidi
A. Parasiticus	Aflatossina B1, B2, G1, G2	
A. Ochraceus	Ocratossina, citrinina, acido penicillico	Orzo, mais, frumento

I danni derivati dalle micotossine dipendono in gran parte dalla quantità assunta e dalla tossicità delle singole molecole, ed esistono studi che indicano, a seconda delle varie specie animali, le dosi tossiche per ciascuna micotossina.
Nella pratica però bisogna tenere ben presente che i danni, soprattutto sul suino, possono essere amplificati dall'associazione contemporanea di differenti tossine che possono essere presenti in un alimento anche in quantità inferiori alla dose tossica.
Le micotossine a volte non vengono rilevate analiticamente perché risultano "*mascherate*" da legami di tipo glucosidico che derivano dall'attività metabolica delle piante infettate, ma non per questo perdono il loro potenziale dannoso; infatti, una volta ingerite, questi legami vengono "rotti" liberando nel lume gastro-intestinale la tossina che è così in grado di tornare a esprimere la sua tossicità originaria.
Anche per questi motivi capita a volte di vedere animali con sintomatologie riferibili a micotossicosi e nello stesso tempo avere le analisi degli alimenti negative.

Le principali micotossine che interessano l'allevamento del suino sono: Aflatossine, Ocratossine, Tricoteceni, Fumonisine, e Zearalenone e i limiti di contaminazione sono regolamentati da: Decreti (Legge e Ministeriale) che sono norme dello Stato, per quanto riguarda le Aflatossine e Ocratossine; mentre Zearalenone, Fumonisine e Tricoteceni sono regolate da Raccomandazioni della Comunità Europea.
Entrambe (DD. e Racc.) stabiliscono i limiti di micotossine che devono essere rispettati, quindi sono apparentemente equivalenti.
La loro differenza pratica sta nelle azioni obbligatorie (controlli ufficiali) e nelle conseguenze

(sanzioni) che vengono messe in opera in caso di irregolarità; infatti la violazione di una norma di legge comporta l'attivazione di controlli ufficiali che si esplicano secondo quanto previsto dalla legge stessa (n° campioni, modalità di prelievo, modalità di analisi, ecc..) e, se confermata, dall'applicazione di sanzioni.
La violazione della Raccomandazione C.E. che disciplina le contaminazioni da micotossine NON prevede l'applicazione di sanzioni, ma siccome potrebbe mettere a rischio la salute animale e/o umana (direttamente o tramite i prodotti derivati) stabilisce che i prodotti contaminati oltre le soglie stabilite NON possano essere messi in commercio.
Le Raccomandazioni sono dei **Valori Guida** indicati dal legislatore europeo che riguardano i livelli massimi di micotossine di cui gli operatori del settore devono tenere conto nella preparazione dei mangimi; esse testimoniano l'attenzione dedicata dalla C.E. sia nei confronti della sicurezza alimentare che del benessere animale e per questo viene richiesta l'attiva collaborazione di tutti gli operatori della filiera.

Tabella 2. AFLATOSSINA B1 (estratto da Decreto Legge n° 149 del 10/05/2004)

Tipologia di alimento	**Valore massimo di AFLATOSSINA B1 µg/kg oppure ppb**
Tutte le materie prime per mangimi	20
Mangimi completi e complementari per **suini** e pollame (escluso animali giovani)	**20**
Mangimi completi e complementari per bovini, ovini e caprini(esclusi animali giovani e da latte)	20
Mangimi completi per vitelli e agnelli	10
Altri mangimi completi	10
Mangimi completi e complementari per animali da latte	5
Altri mangimi complementari	5

Nella Tabella 2 sono riportati i valori massimi di Aflatossina B1 ammessi nelle materie prime e nei mangimi per le diverse specie animali. Si può notare che nella specie suina sono consentiti valori elevati di questa micotossina (20 ppb) e ciò sta a indicare come questo animale sia considerato meno sensibile.
Per quello che riguarda invece tutte le altre micotossine i valori massimi consentiti per il suino sono di gran lunga inferiori rispetto a quelli ammessi nelle altre specie animali. (Tabella 3 e 4)

Tabella 3. OCRATOSSINA A (estratto da Decreto Min. Sal. del 15/05/2006)

Tipologia di alimento	**Valore massimo in OCRATOSSINA A mg/kg oppure ppm**
Cereali e prodotti derivati dai cereali*	**0,25**
Mangimi completi e complementari • Polli • **Suini**	 0,10 **0,05**

Si ritiene utile sottolineare che il Decreto non prevede limiti per l'ocratossina A nei mangimi composti destinati a specie differenti da quelle menzionate.

Tabella 4. Livelli di micotossine raccomandati (estratto da Racc.C.E. n° 576/2006)

MICOTOSSINA	**PRODOTTI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE DEGLI ANIMALI**	**Valori di riferimento** mg/kg (ppm) di mangime con umidità al 12%
Deossinivalenolo	Materie prime per mangimi • Cereali e prodotti a base di cereali • (escluso sottoprodotti del granoturco)* • Sottoprodotti del granoturco*	 8 12
	Mangimi complementari e completi, ad eccezione di Mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi) agnelli e capretti Mangimi complementari e completi per **suini**	5 2 **0,9**
Zearalenone	Materie prime per mangimi • Cereali e prodotti a base di cereali (escluso sottoprodotti del granoturco)* • Sottoprodotti del granoturco*	 2 3
	Mangimi complementari e completi per Vitelli, bovini da latte, ovini, caprini • **Scrofe e suini all'ingrasso** • **Suinetti e scrofette**	0,5 **0,25** **0,1**
Fumonisina B1+B2	Materie prime per mangimi: • Granoturco e prodotti derivati*	 60
	Mangimi complementari e completi per: • **Suini** ed equini (*Equidi*), conigli e animali da compagnia • Pesci • Pollame, vitelli (<4 mesi), agnelli e capretti • Ruminanti adulti (>4 mesi) e visoni	 **5** 10 20 50

Nelle Tabelle 3 e 4 si deve notare che i *cereali e prodotti derivati dai cereali*, e i *sottoprodotti e derivati del granoturco* appaiono sempre contrassegnati da un asterisco al quale corrisponde la seguente nota:

* "Nel caso dei cereali e prodotti a base di cereali somministrati direttamente agli animali occorre prestare particolare attenzione a che il loro utilizzo nella razione giornaliera non comporti un'esposizione degli animali a tali micotossine superiore a quella che comporterebbe una razione giornaliera composta esclusivamente da mangimi completi" .

Questa nota ha implicazioni notevoli perché in sostanza limita a percentuali ben precise nella razione giornaliera o nel mangime completo, l'inclusione del granoturco (o dei cereali per l'ocratossina A) e dei suoi derivati eventualmente contaminati.

Per quanto riguarda l' Ocratossina A la percentuale impiegabile, per cereali e derivati dei cereali contaminati, il valore massimo di tossina è del 20%; per la Fumonisina B1+B2 la quantità massima impiegabile di granoturco e prodotti derivati è del 8,33%; per il Diossinivalenolo è l' 11,25% per i cereali e prodotti a base di cereali, e si riduce al 7,5% per i soli sottoprodotti del granoturco.

Più complesso è l'utilizzo di cereali eventualmente contaminati da Zearalenone. La normativa prevede in questo caso una differenza per i diversi momenti di crescita del suino: per cereali e prodotti a base di cereali (escluso i sottoprodotti del granoturco) non si può superare l'impiego del 5 % nei mangimi per i suinetti e scrofette, e del 12,5 % per scrofe e suini all'ingrasso.

Per quello che riguarda i sottoprodotti del granoturco sempre contaminati al valore massimo, non si può superare il 3,33 % di impiego per i suinetti e scrofette e l' 8,33 % per scrofe e suini all'ingrasso.

Per comprendere meglio il perché di questi differenti valori di micotossine tra cereale e sottoprodotti/derivati nelle diverse normative, dobbiamo prendere in esame quello che avviene durante il processo di molitura dei cereali: di norma all'arrivo del cereale nel mulino (es.mais), si ha la prima fase di pulitura che consiste nella separazione della granella dalle polveri ed eventuali corpi estranei, poi, a seconda delle tipologie di produzione, la granella può venire decorticata e degerminata, in questo caso il germe di mais è destinato all'industria olearia per l'estrazione dell'olio.

La parte rimanente viene di solito "macinata" in maniera più o meno grossolana e vagliata per la preparazione di Grits, che è formato da spezzato degerminato grosso, medio o fine, e parti fini quali farine bramate, fioretto, fumetto e farinette.

Queste differenti fasi di lavorazione coinvolgono porzioni diverse della cariosside di mais: la decorticazione toglie il pericarpo (crusca), la degerminazione separa il germe, mentre gli spezzati grossi, medi, fini e il fioretto derivano dall'endosperma vitreo della cariosside, l'endosperma farinoso dà origine al fumetto, mentre parti fini (farinose e vitree) e pericarpo miscelate insieme danno origine alla farinetta.

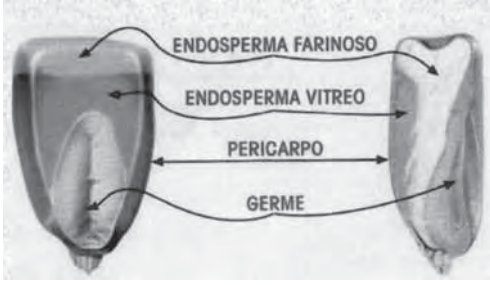


Figura 1. Da Costa e Coll. 2006, parzialmente modificato

Da studi compiuti da Costa e Coll. (2006) si è visto che la ripartizione delle Fumonisine nella cariosside di mais è molto varia trovandosi nel pericarpo per il 49-55%, nell'endosperma farinoso il 28-31%, nell'endosperma vitreo il 7-17%, e infine nel germe solo il 4-6%.
Nei prodotti derivati si assiste ad una diversa ripartizione delle Fumonisine che sarà minore nei prodotti di origine vitrea, per cui negli spezzati e fioretto si trovano tracce di Fumonisine ridotte al 10-30% rispetto ai valori iniziali della granella intera.
Nei prodotti di origine farinosa la concentrazione sarà media, infatti nel fumetto si riduce al 30-60% rispetto alla granella, mentre sarà maggiore nei prodotti contenenti il pericarpo per cui nelle farinette aumenta fino al 200% rispetto alla granella.
Anche nei sottoprodotti del granoturco quali la semola di mais (detta anche farina glutinata o cornglutenfeed che sono sottoprodotti delle amiderie) , il panello di mais o la farina di estrazione di germe di mais (sottoprodotto degli oleifici), e i distillers-DDGS- (sottoprodotto industriale della filiera dell'etanolo) si assiste ad una concentrazione delle micotossine già presenti nel cereale di partenza.
E' evidente quindi che: ***tutti i processi di lavorazione industriale dei cereali provocano una concentrazione delle micotossine già presenti nel cereale di partenza.***

Che cosa possiamo fare per contrastare le diverse micotossine presenti nelle materie prime?

Le azioni da intraprendere nei loro confronti sono le seguenti:

- Prevenzione
- Decontaminazione-Detossificazione
- Adsorbimento
- Biotrasformazione
- Bioprotezione

PREVENZIONE

La prevenzione consiste principalmente nel "prevenire" la contaminazione da funghi e la possibile conseguente produzione e sviluppo di micotossine, riducendo al minimo i cosiddetti "fattori di rischio".
Le azioni di prevenzione possono ridurre e contenere il problema delle micotossine, ma non ne eliminano il rischio.
L'obiettivo sarà quindi quello di ridurre al minimo la formazione di tali tossine attraverso buone pratiche di lavorazione.
È importante che i produttori prendano atto del fatto che le buone pratiche agricole (BPA) rappresentano la prima linea di difesa contro la contaminazione dei cereali, seguite dall'attuazione di buone pratiche di fabbricazione (BPF) durante la manipolazione, lo stoccaggio, la trasformazione e la distribuzione dei cereali destinati all'alimentazione umana e animale.(Raccomandazioni della CE 2006/583)
D'altra parte la contaminazione dei cereali può essere causata da una molteplicità di fattori e le buone pratiche, per quanto accurate, non consentono di controllare tutti questi fattori come ad esempio le condizioni climatiche.
La prevenzione può essere quindi attuata in 3 momenti distinti quali:

- la produzione delle materie prime, attraverso le Buone Pratiche Agricole (BPA)
- la lavorazione delle materie prime, attraverso le Buone Pratiche di Fabbricazione (BPF)
- la produzione dei mangimi attraverso le Buone Pratiche di Produzione (BPP)

Con le **BPA** si cerca di ridurre al minimo il rischio di contaminazione della pianta in campo attraverso:
Rotazione dei raccolti: utilizzare colture diverse dalle graminacee, che non ospitino Fusarium, come ad esempio barbabietole, erba medica, ortaggi, ecc..è un modo per ridurre anche il possibile "inoculo da campo", cioè quella contaminazione delle piante nuove dovuta ad un inquinamento fungino "lasciato" dalle piante vecchie infettate.
Metodologia di lavorazione in campo: ogni operazione finalizzata all'eliminazione, alla distruzione o all'interramento dei residui infestanti dei raccolti , quale l'aratura, consentirà di ridurre l'inoculo da Fusarium nel raccolto successivo.
Riduzione dello "stress dei vegetali": occorre scegliere gli ibridi o le varietà più adatte alla natura del suolo, alle condizioni climatiche e alle pratiche agricole correnti. Va individuato il miglior periodo di semina infatti la semina del mais a maggio è più rischiosa, per il possibile sviluppo di ZEA, FB1, FB2 , della semina a marzo/aprile.
Bisogna per quanto possibile, evitare lo stress delle piante:i fattori di stress sono diversi e tra questi la siccità, il freddo, la densità di semina elevata (> di 7,5/pt/m2 aumenta il rischio di crescita fungina), le carenze nutritive e le reazioni indesiderabili alle sostanze utilizzate nelle coltivazioni.
L'irrigazione è un metodo efficace per ridurre lo stress, così come un apporto nutritivo ottimale è essenziale per evitare l'indebolimento della pianta favorendo quindi un infezione da *Fusarium*.
Bisogna cercare di ridurre l'allettamento e va assicurato un apporto di sostanze nutrienti specifiche per l'area coltivata e per il tipo di specie vegetale.
La quantità corretta di N per ettaro di terreno è di circa 200 kg./ha, quindi bisogna tenere presente che le carenze di N possono favorire lo sviluppo di Fumonisine, mentre gli eccessi di N possono favorire lo sviluppo di ZEA, DON, Ocratossine.
I metodi di lotta contro gli insetti (difesa dalla Piralide) non sembrano, in genere, aver effetto sulla fusariosi. Tuttavia, la lotta contro gli insetti presenti sul granturco può ridurre l'incidenza della marcescenza da *Fusarium* e il conseguente tenore di fumonisine nel granturco.

Raccolta tempestiva dei cereali (es.mais): dal momento della maturazione fisiologica il cereale deve rimanere in campo il meno possibile: infatti la raccolta risulta essere una delle fasi dove è possibile intervenire maggiormente per il controllo delle micotossine. La formazione di questi metaboliti avviene a partire dalla fase di maturazione cerosa della granella e la produzione di Aflatossine è favorita, in campo, da temperature elevate (massima giornaliera superiore a 30°C) e dall'umidità.

Con le **BPF** si cerca di prevenire possibili produzioni di micotossine riducendo le condizioni che favoriscono lo sviluppo dei funghi attraverso:
Metodi di raccolta appropriati e pulitura delle granaglie: per quanto possibile bisogna evitare di causare danni meccanici alle granaglie, e evitare il contatto con il terreno durante le operazioni di raccolta.
I chicchi striminziti, di piccole dimensioni, possono contenere una maggiore quantità di micotossine dei chicchi sani, di taglia normale, quindi è possibile ridurre il rischio da micotossine eliminando tali chicchi con una regolazione corretta della mietitrebbia dopo il raccolto, al fine di eliminare i chicchi danneggiati e altre materie estranee. Alcuni metodi di pulitura, come la setacciatura meccanica, consentono di eliminare chicchi contaminati.
Attenzione ai livelli di umidità delle granaglie: una sensibile riduzione del rischio Aflatossine può essere perseguita raccogliendo la granella con umidità non inferiore al 22%, come peraltro evidenziato dalle esperienze e dai risultati della ricerca e sperimentazione degli

ultimi anni. Si evidenzia che valori di umidità inferiori al 20% sono considerati ad elevato rischio in quanto possono favorire l'accumulo delle aflatossine, soprattutto in annate con andamento stagionale caldo e asciutto. Le partite di mais così raccolte dovrebbero essere separate e stoccate a parte. Effettuare una raccolta anticipata consente anche di ridurre la contaminazione da Fumonisine.

Essiccazione: il tenore di umidità della coltura va determinato durante il raccolto o immediatamente dopo.

I campioni prelevati a tal fine dovranno essere quanto più rappresentativi possibile.

Il raccolto va essiccato al più presto (24-48 h) per raggiungere il tasso di umidità raccomandato per l'immagazzinamento in modo omogeneo. La temperatura di esercizio dell'impianto di essicazione è di 90°C (+/- 20°C) e varia a seconda dell'umidità del prodotto da essiccare e delle condizioni ambientali esterne;

la granella umida va sempre areata prima dell'essiccazione per evitarne il surriscaldamento, inoltre non vanno mescolate partite di cereali che presentano rischi di contaminazione differenti.

Conservazione: dove è possibile, le granaglie vanno aerate per mantenere una temperatura adatta e uniforme in tutta la massa. Il tasso di umidità e la temperatura dei cereali vanno controllati regolarmente durante il magazzinaggio. La formazione di odori può significare che le granaglie si stanno riscaldando troppo, soprattutto se immagazzinate in luogo chiuso. Durante la conservazione la temperatura dei cereali immagazzinati va rilevata ripetutamente a intervalli stabiliti. Un innalzamento della temperatura può indicare una proliferazione microbica e/o un'infestazione da organismi nocivi. Le parti visibilmente infette vanno separate e vanno prelevati campioni da sottoporre ad analisi. In seguito, occorre abbassare la temperatura dei cereali immagazzinati e aerarli frequentemente.

Con le **BPP** si cerca di ridurre al minimo i rischi di contaminazione e sviluppo delle micotossine nei mangimi, sia negli impianti di produzione, sia negli allevamenti

Per quello che riguarda gli IMPIANTI di PRODUZIONE AZIENDALE bisogna:

- Evitare acquisti e utilizzo di materie prime a rischio verificando la provenienza delle merce (tracciabilità)
- Eseguire campionamenti prima di accettare la merce
- Controllare umidità e presenza di insetti che sono i fattori che aumentano il rischio di sviluppo delle micotossine
- Pulire i silos di stoccaggio possibilmente con l'utilizzo di prodotti fumiganti
- Svuotare e pulire periodicamente i diversi punti di passaggio delle materie prime nell'impianto
- Aerare i silos per evitare il surriscaldamento delle materie prime soprattutto in estate
- Utilizzare automezzi per il trasporto del mangime nei diversi siti produttivi che siano in buone condizioni e facili da pulire

Per gli ALLEVAMENTI bisogna:

- Eseguire campioni in contraddittorio al momento del ricevimento della merce
- Pulire periodicamente i silos e/o le aree di stoccaggio della merce (porticati, magazzini) soprattutto in primavera
- Aprire i coperchi dei silos di stoccaggio durante la notte nei mesi estivi per ridurre l'umidità causata dalla condensa che si accumula sulle pareti nelle ore più calde della giornata e che provoca il fenomeno dell' *"impaccamento del mangime"*

- Evitare durante i periodi caldo/umidi di ritirare scorte che durano parecchie settimane (partite voluminose di mangime)
- Evitare di conservare i mangimi finiti (sacchi) all'interno dei locali dell'allevamento
- Mantenere pulite le mangiatoie e i truogoli

Per quanto riguarda i campionamenti bisogna prima di tutto ricordare che**: le micotossine sono distribuite in modo eterogeneo nella materia prima** quindi il prelievo di un *campione rappresentativo* da una partita o da un lotto è molto importante e richiede attenzione perché procedure errate possono influire negativamente sull'attendibilità dei risultati.

Per convenzione i campionamenti si dividono in:
CAMPIONAMENTO STATICO: composto da prelievi effettuati in punti diversi su una massa immobile.
CAMPIONAMENTO DINAMICO: composto da prelievi effettuati in tempi diversi su una massa in movimento.
La seconda modalità di prelievo è considerata più attendibile per la minore variabilità dei risultati di analisi.

In quale occasione dobbiamo richiedere controlli per micotossine:

- Se l'alimento somministrato ha muffe evidenti oppure quando l'alimento è troppo umido o comunque è stato conservato in situazioni che possono aumentare il rischio di sviluppo di funghi e muffe.
- Se si osservano cali importanti nelle produzioni e/o cambiamenti nello stato di salute della maggior parte degli animali non giustificati da problematiche di ordine sanitario
- Quando i sintomi degli animali e i cali di produzione rientrano nei segni tipici degli effetti delle micotossine

Cosa controllare quando si ha il sospetto di una intossicazione da micotossine:

- Prelevare campioni dei singoli ingredienti sospetti di contaminazione
- Prelevare campioni dalla razione completa

La normativa comunitaria stabilisce con il Regolamento C.E. n°401/2006, i metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei livelli di micotossine nei prodotti alimentari (cereali o semi oleosi presenti nei magazzini dei diversi fornitori). Anche i mangimi (semplici e/o composti) possono essere sottoposti a controlli ufficiali e le metodiche di campionamento e analisi sono state recentemente riviste con il Regolamento C.E. n° 152/2009 del 27 gennaio 2009.

DECONTAMINAZIONE-DETOSSIFICAIONE

Nel 2002, in seguito alla Direttiva CE 32/2002 che riguardava le sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali (le micotossine appartengono a questa categoria), l' Autorità Europea decise di vietare la "diluizione" delle materie prime contenenti sostanze indesiderabili oltre i valori massimi ammessi, con altre materie prime non contaminate e/o con mangimi destinati all'alimentazione.
Al tempo stesso si decise di consentire la detossificazione dei prodotti contaminati a patto che tale processo soddisfacesse i criteri di accettabilità, da definirsi a livello Europeo (articolo 8 della Direttiva).

Solo dopo alcuni anni i Servizi della Commissione Europea hanno proposto i seguenti criteri di accettabilità:

1) Nel caso di trattamento Fisico bisogna fornire le seguenti informazioni e/o garanzie:
Efficienza del trattamento fisico di Decontaminazione/Detossificazione per ridurre in maniera sufficiente la contaminazione della partita di mangime
Garanzie di un corretto smaltimento della parte rimossa della partita.

2)Nel caso di trattamento Chimico bisogna fornire le seguenti informazioni e/o garanzie:
Dimostrare che la sostanza chimica usata per la detossificazione, non causi residui nocivi nell'alimento detossificato sottoforma di composto o di metabolita della sostanza chimica
Dimostrare che i metaboliti del contaminante, dopo il processo di detossificazione, non mettono in pericolo la salute animale pubblica e dell'ambiente
Dimostrare che il processo di detossificazione è irreversibile
Garantire che le caratteristiche del mangime non sono modificate significativamente dal trattamento di detossificazione

Si è dovuto attendere il Regolamento C.E. n° 767/2009 del 13 luglio 2009(entrerà in vigore il 1 settembre 2010) perché le materie prime per mangimi contaminate da micotossine potessero essere destinate a impianti riconosciuti per la detossificazione , a patto che sull'etichettatura venissero riportate le seguenti indicazioni:

- «mangimi contenenti livelli eccessivi di…. da usarsi a fini di alimentazione animale unicamente previa detossificazione in stabilimenti riconosciuti»
- «mangimi contenenti livelli eccessivi di…. da usarsi a fini di alimentazione animale unicamente previa adeguate purificazione»

Sostanzialmente la decontaminazione/detossificazione consiste nel sottoporre le diverse materie prime contaminate a trattamenti fisici e/o chimici per ridurre il livello di tossine presenti.
I principali trattamenti fisici consistono nel:

- Lavare, sbucciare , pulire l'ingrediente contaminato
- Separare tramite ventilatori e/o setacci i semi contaminati
- Separare per densità (galleggiamento)
- Trattare con calore (autoclave, forno, microonde)
- Irradiare con UV

I trattamenti fisici hanno un'applicazione limitata perché danno **risultati incerti**, producono **perdite di sostanze nutrienti** e sono **costosi**.

I principali trattamenti chimici prevedono l'impiego di prodotti quali:

- Gas di cloro
- Ammoniaca
- Perossido di idrogeno
- Idrossido di ammonio
- Acido cloridrico
- Bisolfuro di sodio
- Formaldeide
- Idrossido di calcio
- Monometilammina

Tali trattamenti hanno scarsa applicazione perché possono produrre **sottoprodotti con tossicità** anche superiore al prodotto di partenza, **influenzano negativamente il valore nutritivo**, **modificano colore e odore dell'alimento** trattato, richiedono **molto tempo** e sono **molto costosi**.

Di fatto tali trattamenti oggi non vengono impiegati nel settore zootecnico.

ADSORBIMENTO

E' di gran lunga la strategia più praticata, ed anche quella nella quale l'offerta di prodotti sul mercato è più variegata ed articolata. La teoria alla base è che le sostanze contenute nei prodotti "leghino" le micotossine in modo così intenso da evitare o ridurre ogni loro interazione con l'organismo animale, in primo luogo evitandone o riducendone l'assorbimento intestinale.
I materiali adsorbenti via via presi in considerazione sono il carbone vegetale, gli alluminosilicati naturali e lavorati industrialmente (i c.d."sintetici"), complessi di carboidrati indigeribili (cellulosa, polisaccaridi estratti dalla parete di lieviti e batteri come i glucomannani ed i peptidoglicani), e polimeri sintetici come la colestiramina ed i derivati del polivinilpirrolidone.
La valutazione delle capacità di fissazione dei diversi prodotti alle differenti micotossine può avvenire con metodi *in vitro* oppure *in vivo* (questi ultimi generalmente misurando le prestazioni degli animali, o considerando parametri biochimici che potrebbero venire influenzati dalla micotossina oggetto della valutazione). In linea generale, la bibliografia non riporta una convincente correlazione tra i risultati di sperimentazioni *in vitro* ed *in vivo*.
In più le metodiche usate e riportate in letteratura, sia *in vivo* che *in vitro,* sono spesso tra loro differenti, per cui anche riconosciuti esperti della materia si sono trovati in difficoltà nell'effettuare delle meta-analisi accettabili sulla massa delle pubblicazioni disponibili.
Recentemente il TNO (Nutrition and Food Research Institute, Zeist, NL) ha messo a punto e validato un sistema di laboratorio per simulare il tratto gastrointestinale dei monogastrici, il quale riproduce una serie di parametri variabili, quali le caratteristiche del pasto, la velocità di transito, il pH gastrico e le secrezioni intestinali, nonché l'assorbimento dei prodotti digeriti (Avantaggiato, 2004). Questo non ha impedito e non impedisce la pubblicazione di articoli scientifici successivi, basati su altri metodi e differenti presupposti, pur rimanendo sulla stessa questione scientifica – nel caso specifico, la capacità di fissazione di diverse sostanze verso le micotossine da *Fusarium* - (Sabater Vilar et al., 2007).

IL CARBONE VEGETALE

E' un materiale assorbente generale, dotato di un'ampia superficie di scambio , e viene raccomandato anche per il trattamento di numerose tossicosi digestive. Gli effetti misurati nella letteratura sono variabili, con una prevalenza di buoni risultati *in vitro* rispetto a quanto si osserva *in vivo*. Mentre per ciò che riguarda la capacità di fissare le aflatossine il carbone non mostra di avere qualità superiori ai leganti minerali, esso ha mostrato avere una buona affinità sulle micotossine da *Fusarium* sia *in vitro* che nel citato modello gastrointestinale del TNO (Doll et al, 2004; Bueno et al, 2005; Avantaggiato et al, 2005, Sabater Vilar et al., 2007).
Elementi di difficoltà nella diffusione del carbone come adsorbente delle micotossine da *Fusarium* sono probabilmente da mettersi in relazione col fatto che le dosi di inclusione necessarie per avere una buona risposta in termini di adsorbimento delle micotossine (tra lo 0,5 e l'1% del mangime) generano un intenso colore nero del mangime stesso, rendendolo poco commerciabile, mentre è possibile che possano interferire con i processi di digestione ed assorbimento dei nutrienti.

I SILICATI

Essi possono essere utilizzati sia in forma naturale (cioè nella forma fisica in cui sono reperibili in natura), generalmente appartenendo alle subclassi dei phyllosilicati e dei tettosilicati, sia nella forma che talvolta viene definita "sintetica", termine che in realtà intende descrivere procedimenti industriali variabili, basati sulla idratazione completa del silicato, e sulla sua successiva essiccazione rapida ad altissime temperature. Questo processo, se da un lato consente di effettuare una purificazione della composizione chimica del materiale, dall'altro soprattutto ne incrementa di diversi ordini di grandezza (fino a 100 volte) la porosità e la finezza della microstruttura, aumentando di conseguenza la superficie di scambio. In altro modo questi tipi di silicati vengono definiti con l'acronimo inglese HSCAS (alluminosilicati *idrati* di sodio e di calcio). La differente superficie di scambio giustifica il diverso dosaggio consigliato (inferiore allo 0,5% per i silicati sintetici, dall'1 al 2% per quelli naturali).

Una grande massa di pubblicazioni ed il consolidato uso in avicoltura e nutrizione bovina certificano l'efficacia dei silicati nell'adsorbire l'aflatossina, anche nella molto meno studiata specia suina (Colvin et al., 1989; Harvey et al., 1989; Lindemann et al., 1993), mentre, salvo occasionali riscontri, i silicati non mostrano una particolare efficacia nei confronti delle tossine da *Fusarium* e dell'ocratossina.

Stante quindi il modesto impatto della aflatossina B1 (ai livelli che è storicamente possibile rilevare in Italia) sulla salute del suino, e considerato il suo quasi inesistente ruolo di carry-over di metaboliti della tossina nel piatto dei consumatori, appare di ben difficile giustificazione il riscontro di un amplissimo uso di prodotti a base di silicati per la prevenzione delle micotossicosi in ambito suinicolo.

POLIMERI ORGANICI E SINTETICI

La semplice fibra indigeribile ha mostrato un potenziale nell'adsorbimento delle micotossine ; infatti la fibra purificata di erba medica ha ridotto gli effetti dello zearalenone nel suino (James et al., 1982, Stangroom et al., 1984), così come materiali fibrosi ottenuti dalla parete cellulare di lieviti hanno talvolta mostrato la capacità di legare diverse micotossine (Devegowda et al., 1998).

Di maggiore interesse appaiono però i glucomannani esterificati, polimeri estratti con procedimenti industriali diversi (e proprietari delle diverse Imprese) dalla parete di alcuni ceppi di lievito di birra, standardizzati nella loro composizione, che hanno mostrato attività verso numerose micotossicosi miste nel suino, a dosi variabili tra lo 0,1 e lo 0,2% dei mangimi (Freimund et al., 2003; Swamy et al., 2002).

Rispetto ai silicati, dunque, i glucomannani esterificati mostrano una meno intensa affinità nei confronti della aflatossina, ma apparentemente una maggiore capacità di legare le altre micotossine, in particolare quelle da *Fusarium*.

A favore dei glucomannani esterificati gioca la necessità di basse inclusioni, che quindi limitano *ab origine* possibili perplessità in merito ad interferenze sull'assorbimento dei nutrienti.

La colestiramina è una resina usata per scopi farmaceutici per ottenere la diminuzione del colesterolo. Adsorbe quasi il 100% di Zearalenone dai liquidi gastrici ed intestinali se usata ad una concentrazione superiore all'1%. L'efficacia della colestiramina nei confronti della Fumonisina è stata confermata dagli esperimenti in vivo con i ratti. (Avantaggiato et al, 2005).

E'in grado di far diminuire la concentrazione di Ocratossina nel plasma. L'alto costo della colestiramina la rende economicamente proibitiva.

BIOTRASFORMAZIONE

La detossificazione delle micotossine in ambito intestinale può anche avvenire attraverso la loro trasformazione in sostanze prive di attività tossica: tale trasformazione può avvenire grazie ad enzimi esogeni, o a ceppi di batteri o lieviti capaci di metabolizzare le tossine detossificandole.
Le matrici sulle quali sono stati ricercati questi ceppi di lieviti o batteri sono particolarmente il rumine (che è stato selezionato filogeneticamente per agire, oltre che come pre-digestore biodinamico, anche come "filtro" biologico per molte sostanze tossiche, tra cui evidentemente alcune micotossine) e dal terreno, nel quale quasi ogni sostanza subisce, nel tempo, fenomeni irreversibili di biotrasformazione.
La letteratura riporta effetti promettenti su Zearalenone e Ocratossina A da parte di *Trychosporum mycotoxinivorans,* un lievito attivo isolato dalle termiti che produce un enzima specifico con la capacità di detossificare le due micotossine nel tratto intestinale, modificandone in maniera selettiva ed irreversibile la struttura chimica (Politis et al., 2005, Schatzmayr et al., 2006)**.**
Dal fluido ruminale è stato invece isolato *Eubacterium BBSH 797,* il quale sarebbe in grado, in sede intestinale, di detossificare i tricoteceni modificandone la struttura chimica (Awad et al., 2006). Occorre dire che soluzioni di questo tipo, assai selettive e mirate, allo stato delle cose non hanno ancora varcato la soglia della sperimentazione, e non hanno ancora ottenuto, in Europa, la licenza di commercializzazione.

BIOPROTEZIONE

In termini di patologia indotta, le micotossine in generale interferiscono sulla sfera dello status ossidativo e dell'immunosoppressione (spesso mediata essa stessa da un eccesso di ossidazione).
E' quindi possibile che, a fronte di quelle già ricordate situazioni o periodi dell'anno di possibile maggiore incidenza di micotossine negli ingredienti, rispetto alle quali quasi sempre il nutrizionista reagisce inserendo in formula una qualche fonte di sostanze sequestranti, una gestione attenta dei fattori antiossidanti presenti nei mangimi (in particolare Vitamina E, C, e selenio in forma organica) possono contribuire ad alleviare i danni indotti dal consumo di alimenti contaminati (Alpsoy et al., 2009; Dvorska et al., 2007). Occorre tuttavia notare come, quando questo presupposto teorico sia stato verificato in allevamento, i risultati siano stati non sempre soddisfacenti (Harvey et al., 1994).
Sempre in campo di bioprotezione, e con riferimento specifico alla ocratossina, alcuni ricercatori tedeschi hanno compreso come una alcalinizzazione di urgenza delle urine dei suini, ottenuta con larghe dosi di sodio bicarbonato (2% nel mangime) favorisce grandemente la rapidità di eliminazione della micotossina attraverso le urine (+ 75 % rispetto al controllo) , proporzionalmente limitandone il potenziale di rischio per gli animali e per l'uomo consumatore dei suoi prodotti (Blank et al., 2004). Una possibile spiegazione di questo fenomeno risiede nella riduzione del riassorbimento renale della tossina in circolo, che verrebbe inibito dalla sua alcalinizzazione.

CONCLUSIONE

Le micotossine rappresentano un pericolo subdolo, ma costante, per la produttività degli allevamenti.
Per questo occorre fronteggiarne i danni nella maniera più efficace possibile, sempre

tenendo in conto il necessario calcolo del rapporto costo/beneficio.
La letteratura pubblicata offre una quantità gigantesca di dati: ad esempio alla voce : "mycotoxins swine" PubMed propone 1015 referenze bibliografiche, a "zearalenone swine" ne propone 181, e così via.
Tuttavia le informazioni riportate non sono facilmente confrontabili tra loro, perchè – come già accennato – le metodiche sperimentali non sono equivalenti, e pertanto il lettore volonteroso ma non specificatamente preparato si trova in grosse difficoltà nella interpretazione di questa massa di dati.
La norma europea aiuta in qualche modo a risolvere alcune problematiche, lasciando spazio all'uso di additivi "sequestranti" solo in caso di prevenzione della contaminazione: non è infatti consentito preparare mangimi con derrate accertatamente contaminate, nemmeno previa loro diluizione.
La scelta di quale strategia utilizzare nei periodi a rischio, dunque, discende dal tipo di micotossina che si attende come più probabile: se è prevalentemente aflatossina, allora i prodotti a base di silicati saranno ampiamente da preferire. Se invece ci si attende altro che non sia l'aflatossina (indipendentemente fusariotossine o ocratossina) allora la scelta dovrà essere limitata ai prodotti a base di carbone vegetale (per i quali persiste il beneficio del dubbio sulla loro assorbenza non selettiva alle dosi utili) o a quelli a base di glucomannani esterificati.
Su quale prodotto commerciale scegliere, nell'ambito della variegata offerta (in assenza di realistiche possibilità di verifica di efficacia da parte del singolo formulista) vale la regola di sempre: i prodotti originali, supportati da una base di ricerche pubblicate su riviste indexate, sono quelli che, in linea generale, offrono le maggiori garanzie e richiedono un prezzo maggiore.
I prodotti generici, di solito supportati solo da dati "in house", in genere hanno un prezzo inferiore, insieme a garanzie inferiori. Questo ovviamente non significa che necessariamente debbano essere peggiori dei prodotti più noti....

Una buona fonte di informazioni sull'argomento è contenuta nei siti:
http://www.knowmycotoxins.com/
http://www.mycotoxins.info/myco_info/myco_info.html
mentre su YouTube c'è addirittura un canale dedicato alle micotossine (in inglese):
http://www.youtube.com/user/MycotoxinChannel

E' inutile ovviamente ricordare che si tratta di strumenti sponsorizzati: sono tuttavia tutti di eccellente livello e latori di informazioni preziose per chi si occupa di nutrizione degli animali.

BIBLIOGRAFIA

Alpsoy L., Agar G., Ikbal M. (2009). Protective role of vitamins A, C, and E against the genotoxic damage induced by aflatoxin B1 in cultured human lymphocytes. Toxicol. Ind. Health. 25(3):183-188.

Avantaggiato G., Havenaar R., and Visconti A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. Food and Chem. Toxicol. 42:817-824.

Avantaggiato G., Solfrizzo M., and Visconti A. (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. Food Additives and Contaminants 22:379-388.

Awad W.A., Böhm J., Razzazi-Fazeli E., Ghareeb K. and Zentek J. (2006). Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. Poult. Sci. 85(6):974-979.

Blank R., Wolfram S. (2004). Alkalinization of urinary pH accelerates renal excretion of ochratoxin A in pigs. J. Nutr. 134(9):2355-2358.

Bueno D.J., Di Marco L., Oliver G. and Bardón A. (2005). *In vitro* binding of zearalenone to different adsorbents. J. Food Prot. 68:613-615.

Colvin B.M., Sangster L.T., Hayden K.D., Bequer R.W. and Wilson D.M. (1989). Effect of high affinity aluminosilicate sorbent on prevention of aflatoxicosis in growing pigs. Vet. Hum. Toxicol. 31:46-48.

Costa E., Pizzolato G., Vanara F., Reyneri A., Causin R., Pietri A., Brera C. (2006). Campionamento dei molini a mais italiani per la ricerca delle fumonisine nei prodotti delle trasformazione industriale.
2° Congresso Nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare" Roma 16-18 ottobre 2006
(comunicazione orale)

Devegowda G.M., Raju V.L.N. and Swamy H.V.L.N. (1998). Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. Feedstuffs 70:12-16.

Döll S., Dänicke S. (2004). *In vivo* detoxification of fusarium toxins. Arch. Anim. Nutr. 58:419-441.

Döll S., Dänicke S., Valenta H. and Flachowsky G. (2004). In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. Arch. Anim. Nutr. 58:311-324.

Dvorska J.E., Pappas A.C., Karadas F., Speake B.K. and Surai P.F. (2007). Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 145(4):582-587

Freimund S., Sauter M. and Rys P. (2003). Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. J. Environ. Sci. and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 38:243-255

Harvey R.B., Kubena L.F. and Elissalde M.H. (1994). Influence of vitamin E on aflatoxicosis in growing swine. Am. J. Vet. Res. 55(4):572-577.

Harvey R.B., Kubena L.F., Phillips T.D., Huff W.E. and Corrier D.E. (1989). Prevention

of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium alluminosilicate to the diets of growing barrows. Am. J. Vet. Res. 50:416-420.
James L.J. and Smith T.K. (1982). Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. J. Anim. Sci. 55:110-118

Lindemann M.D., Blodgett D.J., Kornegay E.T. and Schurig G.G. (1993). Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. J. Anim. Sci. 71:171-178.

Politis I., Fegeros K., Nitsch S., Schatzmayr G. and Kantas D. (2005). Use of Trichosporon mycotoxinivorans to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. Br. Poult. Sci. 46(1) 58-65

Sabater Villar M., Malekinejad H., Selman N.H., Van der Doelen M.A. and Fink-Gremmels J. (2007). *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxyvalenol and zearalenone mycotoxicoses. Mycopathologia 163: 81-90

Schatzmayr G., Zehner F., Täubel M., Schatzmayr D., Klimitsch A., Loibner A.P. and Binder E.M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. Mol. Nutr. Food Res. 50(6):543-551.

Stangroom K.E. and Smith T.K. (1984). Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis in rats and swine. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62:1219-1224

Swamy H.V.L.N., Smith T.K., MacDonald E.J., Boermans H.J. and Squires H.J. (2002). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. J. Anim. Sci. 80:3257-3267.

NORMATIVE

Direttiva CE n.32/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002 relativa a “le sostanze indesiderabili nell’alimentazione degli animali”
Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea del 30 maggio 2002

Decreto Legislativo 10 maggio 2004, n.149 “Sostanze e prodotti indesiderabili nell’alimentazione degli animali”
Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n.139 del 16 giugno 2004

Regolamento CE n.401 del 23 febbraio 2006 relativo ai “Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari”
Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea del 9 marzo 2006

Decreto Ministero della Salute del 15 maggio 2006 “Determinazione dei limiti di ocratossina A negli alimenti per animali”
Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n. 120 del 25 maggio 2006

Raccomandazione CE n.576 del 17 agosto 2006 sulla “Presenza di deossinivalenolo,

zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali"
Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 23 agosto 2006

Raccomandazione CE n.583 del 17 agosto 2006 sulla "Prevenzione e riduzione delle *Fusarium*-tossine in cereali e prodotti derivati"
Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 29 agosto 2006

Regolamento CE n.152 del 27 gennaio 2009 che fissa i "Metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali"
Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 26 febbraio 2009

Regolamento CE n.767 del 13 luglio 2009 su "L'immissione sul mercato e l'uso dei mangimi che modifica il regolamento n.1831/2003 e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio,93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione"
Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 1 settembre 2009

CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE E CATENA ALIMENTARE

DR. DR. H.C., PROF. EM. GIOVANNI BALLARINI

PREMESSE

La presenza di micotossine negli alimenti vegetali o di origine animale pone molti e complessi problemi, solo in parte affrontati e lungi dall'essere ancora risolti, anche se per molti dei più importanti e significativi aspetti sono già stati raggiunti risultati significativi. In questa prospettiva la presente esposizione è articolata in due parti: nella prima sono sinteticamente considerate le attuali sfide della contaminazione da micotossine con particolare riguardo alla filiera della produzione suina e nella seconda parte sono approfonditi i principali aspetti della contaminazione da ocratossine nella fase della produzione salumiera.

LE SETTE SFIDE DELLE MICOTOSSICOSI NELLE DERRATE ALIMENTARI

La presenza e le patologie da micotossine nelle derrate animali sono un tema emergente che viene da lontano. Micotossine e micotossicosi non sono problemi nuovi, molti aspetti sono oggi ben conosciuti, come pure i mezzi di controllo disponibili, mentre si stanno affrontando i principali aspetti e problemi di filiera. Con particolare attenzione alla Questione Micotossine e Micotossicosi nell'allevamento suino, Sette Sfide operano nell'area della diversità biologica delle micotossine e micotossicosi e nell'area del rischio. Nell'area della diversità ricadono: 1 - questione biologica; 2 - questione ambientale e tecnologica; 3 - questione filiera. Nell'area del rischio: 4 - valutazione del rischio; 5 - gestione del rischio; 6 - percezione del rischio; 7 - comunicazione del rischio. In rapida sintesi sulle ora indicate Sette Sfide è opportuno ricordare quanto segue.

1 - Questione Biologica. Numerose sono le specie di miceti produttori di micotossine, numerose le micotossine, senza coerenza univoca tra specie e micotossine. Principali muffe produttrici di micotossine che interesano l'allevamento suino sono le aflatossine e le ocratossine, senza dimenticare i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, il termogene, le ergoline. Attenzione oggi viene posta anche a micotossine come la citrinina e la sterigmatocistina.

2 - Questione Ambientale e Tecnologica. Produzione di micotossine e micotossicosi suine oggi si pongono tra agricoltura ed industria, in quanto l'ambiente condiziona: 1) lo sviluppo delle muffe; 2) la produzione di micotossine; 3) le tecniche di "risanamento", peraltro molto limitate.

3 - Questione Filiera. Produzione della micotossine e micotossicosi sono tipici problemi di una filiera che considera: 1) produzione agricola campo; 2) conservazione e trasporto in silo; 3) mangimifici e loro silo; 4) allevamento e conservazione in silo: 5) allevamento con particolare riguardo al "filtro animale"; 6) trasformazione conservazione stagionatura delle carni suine; 7) fase del consumatore (dispensa e frigorifero domestico).

4 – Questione Valutazione del Rischio. Anche per micotossine e micotossicosi bisogna partire dalla distinzione tra pericolo e rischio. Pericolo è la capacità che un composto, oggetto, entità biologica (tossina, batterio o virus ecc.) di provocare un danno. Rischio è la probabilità che un pericolo provochi un danno, in un periodo di tempo definito (il rischio dev'essere espresso in termini numerici). Nella valutazione del rischio, *il rischio dev'essere valutato in modo obiettivo ed espresso in termini numerici,* senza tuttavia dimenticare il necessario *principio di precauzione*. Nella valutazione del rischio micotossine in suinicoltura bisogna sottolineare i passaggi dal rischio di settore al rischio di filiera, dal rischio zootecnico al rischio per la salute umana, dal rischio tossico al rischio cancerogeno. Nella valutazione del rischio diviene importante la questione dei limiti massimi tollerati che è stata individuata

solo per alcune micotossine e singolarmente, non in eventuali associazioni, peraltro non rare. Per quanto riguarda la filiera suina bisogna ricordare i limiti posti per l'aflatossina B e l'Ocratossina negli alimenti per animali.

5 - Gestione del Rischio. Nella gestione del rischio gli interventi devono essere compiuti nei "punti critici" di produzione del rischio (campo, silo, trasformazione alimenti), con una gestione del rischio a livello di filiera effettuando un'auto-gestione ed un controllo pubblico.

6 - Percezione del Rischio. Oggi si ritiene possibile una valutazione scientifica della percezione del rischio, sia a livello pubblico che della gente comune, considerando che la percezione del rischio comprende la paura di pericoli che non sono noti, sono ritenuti possibili o solo od ipotizzati.

7 - Comunicazione del Rischio. Per superare la complessità della comunicazione del rischio alimentare bisogna porsi la domanda "qual é il problema del consumatore nella comunicazione del rischio?". In questo orientamento *la comunicazione è un processo essenziale di trasmissione di significati tra individui* e consiste nello scambiare o fornire informazioni al fine d'informare, o persuadere od allertare qualcuno sui rischi per la salute. Bisogna inoltre ricordare che nella valutazione e accettazione di un rischio da parte della popolazione è molto importante come il rischio è percepito ed a questo riguardo è necessario distinguere il rischio obiettivo dal rischio percepito (soggettivo). Inoltre, dalla informazione passiva è necessario passare alla partecipazione attiva, nella quale vi è un ruolo ruolo dell'industria e della distribuzione, dal controllo alla partecipazione, dall'infomazione all'educazione, dalla sicurezza biologica alla sicurezza psicologica.

OCRATOSSINE NELLE PRODUZIONI SALUMIERE

Ocratossine ed ocratossicosi suine

Le ocratossine sono micotossine, prodotte da muffe che si sviluppano soprattutto sulle granaglie, dotate di potente attività nefrotossica, cancerogena ed immunodepressiva. Per questi motivi vi è un particolare interesse per le ocratossine che possono trovarsi negli alimenti degli animali, in particolare del maiale, anche per i possibili riflessi sulla salute del consumatore. La patologia suina da ocratossine non è nuova. Le lesioni renali sembra siano state per la prima volta segnalate da Larsen nel 1928. In questi ultimi tempi, da quando si è dimostrata l'attività cancerogena delle ocratossine e soprattutto la presenza di loro residui non solo nelle frattaglie (rene e fegato) dei maiali, ma anche nel muscolo e nel grasso, soprattutto nei paesi dell'Europa settentrionale, le ocratossine sono riconosciute come un problema di salute pubblica (Gareis e Wolff, 2000). Bisogna inoltre considerare che nell'Unione Europea, con l'attuazione del mercato unico, vi è la libera circolazione degli alimenti e che l'Italia è una forte importatrice di carni suine, soprattutto dopo il fenomeno BSE che ne ha fatto lievitare la richiesta, tanto che oggi si stima che il consumo italiano di maiale (valutato come peso di carcassa) si situi tra 34 ed i 36 chilogrammi per persona e per anno. In quest'orientamento si pone la necessità di una migliore conoscenza dell'ocratossicosi suina anche sotto l'aspetto di rischio alimentare umano, pur rilevando che per l'uomo i rischi maggiori sembrano doversi attribuire agli alimenti d'origine vegetale, più che a quelli d'origine animale. Per quanto concerne il maiale e le produzioni salumiere, una particolare attenzione va dedicata alle ocratossine che, per questo, meritano un breve cenno.

Le ocratossine sono elaborate da miceti del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, ma soprattutto dall'*Aspergillus ochraceus* e *Penicillum verrucosum* var. *verrucosum*, in particolare quando si sviluppano sull'orzo, segale ed altre granaglie di graminacee, conservate a livello aziendale in condizioni adatte allo sviluppo della muffa. Le ocratossine si presentano sotto forma di numerosi analoghi e metaboliti. Sono importanti soprattutto le Ocratossine

A, B (decloridrata), C (etilestere) ed i metaboliti alfa (OA senza fenilalanina), OA-OH (idrossilata), OP-OA (con il nucleo del lattone GA aperto) (Li e coll., 1997). Particolare attenzione è stata dedicata alle attività tossiche dell'ocratossina A. Queste sono note da tempo e la valutazione del rischio tossicologico associato alla sua assunzione ha portato nel 1993 la IARC a classificarla come cancerogeno di classe 2B, cioè possibile cancerogeno per l'uomo ed accertato cancerogeno per gli animali (IARC, 1993; Marquardt e Frohlich, 1992; Roschentaler e coll., 1984).

Mentre l'assunzione delle ocratossine da parte degli animali avviene per via digestiva, l'eliminazione si effettua attraverso la bile e le urine. Dopo assunzione, nel maiale le maggiori concentrazioni d'ocratossina si hanno, in ordine decrescente, nel rene, fegato, carne magra e grasso (Madsen e coll., 1983). Secondo Rutqvist e coll. (1978) nel rene l'ocratossina raggiunge concentrazioni da 5 a 13 volte superiori a quelle ematiche (sangue o plasma). La farmacocinetica delle ocratossine, in particolare della A, dimostra che l'eliminazione avviene con un ritmo molto diverso per le singole ocratossine e loro metaboliti. Li e coll. (1997) nel ratto hanno visto che il tempo massimo di dimezzamento (emivita) è di 103 +/- 16 ore. Dopo aver somministrato ocratossina A a maiali, Krogh e coll. (1976) hanno costatato che le più alte concentrazioni si hanno nel rene e le più basse nel grasso. Inoltre, i residui di ocratossina scompaiono dal muscolo e dal grasso con un tempo di sospensione di due settimane, mentre per il fegato sono necessarie tre settimane e per il rene quattro settimane. L'eliminazione segue una curva esponenziale.

Origine, patologia e diagnosi dell'ocratossicosi del maiale

Diversi cereali, e soprattutto l'orzo, sono naturalmente contaminati dalle muffe che producono ocratossine. Le condizioni favorevoli allo sviluppo delle muffe sulle granaglie e successivamente alla produzione da parte delle muffe di micotossine sono in linea generale note: umidità e temperatura. Le concentrazioni d'ocratossina negli alimenti contaminati variano ampiamente, ma non mancano casi nei quali l'ocratossina A raggiunge i 4.000 mg/kg (Tapia e Seawright, 1984). Un corretto essiccamento delle granaglie ed una loro buona conservazione sono assolutamente indispensabili per evitare le contaminazioni da micotossine, in particolare da ocratossina, in quanto poco efficaci sono trattamenti per detossificare cereali contaminati da ocratossine (Madsen, 1983). Attualmente non vi sono precise e specifiche normative che riguardano i livelli d'ocratossine negli alimenti per animali ed in particolari per i suini, anche se si accetta come limite massimo "normale" il livello di 5 microgrammi per chilogrammo (Jarczyk e coll., 1998). E' comunque prevedibile che si debba intervenire al fine di controllare il rischio per il consumatore, anche se è necessario precisare che *attualmente i livelli d'ocratossine che sono stati rilevati nella dieta umana derivano più dagli alimenti vegetali, che da quelli d'origine animale*.

La somministrazione al maiale d'orzo od altri cereali contaminati da ocratossine provoca nell'animale riduzione della fame, peggioramento dell'incremento ponderale giornaliero e dell'indice di conversione alimentare, aumento di consumo d'acqua (Madsen e coll., 1983) e, soprattutto, la comparsa di lesioni renali. Le ocratossine nel maiale provocano anche immunodepressione, mentre non vi sono elementi chiari per patologie di tipo neoplastico che, nel maiale, sono relativamente rare, anche per la breve vita dell'animale. Di particolare interesse sono le patologie renali, che assumono anche un ruolo come "indicatore" a livello d'allevamento. Le lesioni nefropatiche da ocratossine si manifestano con aumento di volume dell'organo (da una volta e mezzo a due volte). La superficie dell'organo ha un aspetto granuloso ed un colore grigiastro, con piccole cisti di un millimetro di diametro. Al taglio si osserva un aumento dello stroma connettivale, soprattutto centrale. Nei casi gravi vi é una sclerosi con indurimento del parenchima, che resiste allo schiacciamento con il dito. Microscopicamente si rilevano fenomeni necrotici, soprattutto ai tubuli prossimali dove

si concentra l'ocratossina, seguiti da completa atrofia dei nefroni e delle membrane basali, con degenerazione ialina del glomerulo (Elling, 1979). Per quanto riguarda le patologie renali, Kryschanoffsky (1988) ha dimostrato presenza di ocratossina A nell'88,75% dei reni patologici e risultati analoghi sono stati ottenuti da diversi ricercatori, tra i quali Golinski e coll. (1985), Bauer e coll. (1984), Krogh (1977). Nelle ricerche sperimentali di Krogh e coll. (1976), lesioni renali sovrapponibili a quelle spontanee sono state ottenute con la somministrazione di ocratossina A cristallina somministrata nell'alimento, alla concentrazione di 1 mg/kg (1 ppm) e per la durata di tre mesi. Lesioni renali sono state anche rilevate in altre ricerche da Krogh e coll. (1974), che hanno somministrato per quattro mesi a maiali mangimi contaminati con ocratossina A, a livelli di 200 - 1000 - 4000 microgrammi per chilogrammo d'alimento e paragonabili a quel li rilevati per le contaminazioni naturali, alla macellazione hanno trovato residui nel rene, fegato, muscolo e tessuto adiposo. Altre indagini sono state eseguite da Tapia e Seawright (1984). Recentemente, anche per il maiale, Muller e coll. (2000) hanno dimostrato che l'ocratossina A induce modificazioni ematiche ed aggrava patologie polmonari, per fenomeni d'immunodepressione.

Solo in caso di elevate e protratte contaminazioni alimentari da ocratossine è possibile rilevare sintomi clinici nei maiali. La citata riduzione della fame, il peggioramento dell'incremento ponderale giornaliero e dell'indice di conversione alimentare, l'aumento di consumo d'acqua sono sintomi troppo generici per avere un reale significato diagnostico. In modo analogo è per l'immunodepressione, mentre non vi sono elementi chiari per patologie di tipo neoplastico che, nel maiale, sono relativamente rare, anche per la breve vita dell'animale. Di particolare interesse sono invece, al macello, le patologie renali, del tipo sopra descritto, in quanto assumono un ruolo come "indicatore" a livello d'allevamento. Soprattutto nei casi di sospetto è indispensabile poter effettuare indagini diagnostiche d'identificazione delle ocratossine sui maiali al macello, ma soprattutto su quelli in allevamento. *Infatti, una diagnosi in allevamento può permettere interventi tali da evitare che gli animali arrivino al macello con residui di ocratossine nelle carni*. Diverse indagini hanno stabilito il ruolo che hanno i metodi immunochimici (ELISA), ma soprattutto i metodi HPLC (Frohlich e coll., 1997; Fukal, 1991; ed altri), ma soprattutto che le ricerche diagnostiche di laboratorio, eseguite sul sangue dei maiali, sono molto più efficaci del semplice rilievo delle lesioni renali al macello (Fukal, 1991; Muller e coll., 2000). Secondo Hult e Chelkowski (1991) e Holmberg e coll. (1990) il monitoraggio ematico con pool di sangue può essere usato a livello d'allevamento.

Ocratossine negli alimenti per suini e rischio umano

Secondo Lawlor e Lynch (2001) il 25% dei raccolti vegetali mondiali contengono micotossine, che provocano significative perdite economiche e costituiscono un rischio per la salute umana, sia direttamente (alimenti destinati all'uomo) che indirettamente, tramite il latte e le carni prodotti da animali alimentati con foraggi con micotossine. Il rischio derivante dalla presenza di micotossine negli alimenti utilizzati dall'uomo è documentato anche dalla segnalazione della presenza nel sangue e nel latte umano di una micotossina in particolare, l'ocratossina A. anche nella popolazione italiana, già una decina di anni fa (Mico et al 1991 - 1995). L'ocratossina A persiste a lungo nel sangue dell'uomo dato che ha una emivita di circa 35 giorni. Dati riscontrati in via molto recente confermano il problema dell'esposizione delle nostre popolazioni a questa micotossina, dato che in campioni di latte umano è stata riscontrata una positività superiore all'80%. Dall'esame delle diete sembra che l'origine prevalente della contaminazione siano i cereali, probabilmente il pane (Piva, 2001). Nelle citate ricerche di Krogh e coll. (1974) risulta che suini appartenenti a partite nelle quali vi sono casi di nefropatia tossica e quindi provenienti da allevamenti nei quali sono stati usati alimenti contaminati da ocratossine, residui di queste sono presenti nel rene, fegato, muscolo e tessuti adiposi, con concentrazioni via via scalari. In Polonia, secondo Golinski e coll. (1986),

circa un terzo dei suini macellati contiene nel sangue ocratossina a livelli rilevabili e diverse altre ricerche, compiute nei paesi nordici a clima freddo e dove il maiale è frequentemente alimentato con orzo, hanno confermato questo dato, sia pure con percentuali variabili. Esiste inoltre la gran sovrapponibilità tra le lesioni che l'ocratossina A induce nel rene del maiale e quelle che sono state rilevate nell'uomo soprattutto nella regione dei Balcani (Pepeljnjak e Cvetnic, 1985). Anche nei reni umani sono state trovate ocratossine (Bauer e coll., 1984). Se quindi è da ritenere che le ocratossine e soprattutto l'ocratossina A presenti nei vegetali ed in particolare in alcune granaglie e derivati ma anche in alcune bevande di largo consumo (es. vino rosso proveniente da certe aree del nostro paese) (Pietri et al 2001), rappresentino un rischio per l'uomo, non vi sono specifici ed attendibili studi che quantifichino il ruolo delle carni suine quali cause di patologie umane. E' infatti da ritenere che anche nei casi sopra citati di patologie umane riportabili ad ocratossine, il rischio sia totalmente od in massima parte da riportare agli alimenti vegetali contaminati e che il maiale abbia, invece, una funzione di "filtro", con almeno parziale attività protettiva. L'entità del trasferimento nelle carni di maiale non è nota, ma è verosimilmente da ritenere sia molto bassa, se si pensa che nel latte di scrofa il carry-over è dell'ordine del 2-3% (Piva & Pietri, 2001). Il latte bovino, almeno nelle nostre condizioni di allevamento medio è da ritenere del tutto indenne, dato che in questo animale si aggiunge l'attività fermentativa del rumine, che quindi sembra essere un'ulteriore, ottima barriera. *E' comunque necessario ridurre l'esposizione umana alle micotossine e, nel caso specifico, alle ocratossine ed adottare accorgimenti alimentari che ne riducano i danni*. Le ricerche sperimentali (Elling 1983; ed altri) indicano che le lesioni renali non sono un indicatore di rischio sufficiente. Infatti, una dieta contenente 1380 microgrammi d'ocratossina A per chilogrammo d'alimento e somministrata a maiali per due mesi, non sviluppa lesioni renali macroscopiche (Elling, 1983), mentre ovviamente vi sono residui significativi nelle carni. Dati sperimentali evidenziano che, a parità di ingestione di ocratossina A nella dieta, le lesioni agli organi bersaglio possono essere maggiori o minori in funzione dell'assenza o presenza di fattori protettivi nella razione.

Alimenti di origine animale e rischio umano

Si è sopra ricordato che le attività tossiche dell'ocratossina A sono note da tempo e la valutazione del rischio tossicologico associato alla sua assunzione ha portato nel 1993 la IARC a classificarla come cancerogeno di classe 2B, cioè possibile cancerogeno per l'uomo ed accertato cancerogeno per gli animali (IARC, 1993; Marquardt e Frohlich, 1992; Roschentaler e coll., 1984). E' qui necessario aggiungere che il Ministero della Sanità italiano, con la circolare del 9 giugno 1999, con la quale prevedeva il recepimento delle direttive comunitarie in materia di valori massimi d'aflatossine, in base anche al parere favorevole dell'Istituto Superiore di Sanità, ha fissato per il territorio nazionale i valori guida per la contaminazione da ocratossina A in alcuni alimenti, tra i quali la carne suina e prodotti derivati. Per questi ultimi il valore limite indicato è pari a 1 μg/kg. Questo valore è indicato anche nella circolare n. 18 del 16 novembre 2000 del Ministero della Sanità, per gli stessi prodotti provenienti da Paesi comunitari od originari da Paesi che hanno sottoscritto l'accordo sullo Spazio Economico Europeo. Va però rilevato che il regolamento (CE) N. 466/2001, che definisce i valori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari e che entrerà in vigore su tutto il territorio dell'UE il prossimo 5 aprile 2001, fra le micotossine, non prende in considerazione l'ocratossina A. Tra i prodotti carnei, quelli d'origine suina sembrano rappresentare la principale fonte di contaminazione della tossina. La presenza d'ocratossina A in tali prodotti può essere attribuita a fenomeni di contaminazione indiretta, o per accumulo della tossina nei tessuti e nei muscoli eduli di animali da reddito, o ad un fenomeno di contaminazione diretta da ceppi tossigeni, quali *P. verrucosum*, ma scarsi sono i dati in letteratura sul tenore di contaminazione della tossina in queste matrici alimentari (Labie

e Tache, 1979; Escher e coll., 1978; Scheuer, 1989, Lusky e coll., 1994). Tutto da verificare è, infine, il ruolo dei residui d'ocratossina nelle carni di maiale, sia per quanto riguarda la loro qualità, sia la quantità. Si è già indicato che esistono diverse ocratossine e che tra queste una sola, l'ocratossina A, è viene considerata a rischio, in quanto *possibile* cancerogeno nell'uomo. Per valutare questo rischio è quindi necessario stabilire le esatte concentrazioni dell'ocratossina A, distinguendola dalle altre. Vi è inoltre l'aspetto quantitativo, vale a dire qual è la soglia da ritenere rischiosa in una dieta media umana e quale, di questa soglia, è riferibile al consumo di carne suina che, come già indicato, ha certamente un ruolo fortemente minoritario.

Controllo dei rischi per l'uomo da ocratossine

I maggiori rischi dell'uomo da ocratossine derivano dagli alimenti vegetali che sono assunti nell'alimentazione (cereali, ma anche caffè, cioccolato ed altri cibi, uva rossa) e loro derivati (birra, vini rossi, uva passita ecc.). E' tuttavia necessario intervenire sui rischi, ancorché molto minori, che riguardano gli alimenti d'origine animale e soprattutto le carni suine.

Circa le carni suine é necessario sottolineare che il problema dell'ocratossicosi è legato al tipo di alimento (orzo, frumento ed anche segale) ed all'area geografica (Balcani, paesi dell'Europa centrale e dell'est europeo come Polonia e Repubblica Ceca e Slovacchia, paesi dell'Europa settentrionale e soprattutto Danimarca). *Nei paesi nei quali l'allevamento suino si basa su cereali quali il mais, come avviene per l'Italia, è da ritenere che il rischio ocratossicosi sia assente, se non molto limitato*. Diverso può essere ilo caso di carni suine importate. A questo riguardo è tuttavia da ricordare che per il controllo del rischio ocratossicosi nei maiali, da tempo le autorità veterinarie danesi fanno il controllo al macello dei reni suini e nelle partite di maiali dove vi sono lesioni renali riportabili ad ocratossicosi eseguono determinazioni della micotossina e condannano la carcassa dei maiali quando le ocratossine nel rene superano i 10 microgrammi per chilogrammo (Elling, 1979, 1983). E' però più efficace un controllo con determinazioni sul sangue, anche come *pool*. Non esistono invece controlli specifici su maiali prodotti ai altre aree a rischio di ocratossicosi, ad esempio i Balcani. In queste aree e sulla base delle ricerche di Krogh e coll. (1976), per evitare un rischio da ocratossina del consumatore, sarebbe sufficiente che i maiali, un mese prima della macellazione, ricevessero un'alimentazione con livelli d'ocratossina sufficientemente bassi. Inoltre è da ricordare che le ocratossine possono trovarsi in alimenti, vegetali e di origine animale, ammuffiti, quindi non prodotti e conservati secondo le buone pratiche, il che può avvenire soprattutto nelle produzioni casalinghe. In queste condizioni l'ocratossina ha la possibilità di penetrare all'interno dell'alimento, con un gradiente che diminuisce del 50% per ogni mezzo centimetro di profondità. Da qui la difficoltà di un ricupero di alimenti con muffe produttrici di ocratossina, eliminando solo la parte superficiale.

Ocratossine e rischio ocratossinico nella filiera delle produzioni di salumeria suina

Per considerare i rischi da ocratossine dell'uomo da alimenti d'origine suina è necessario distinguere le carni suine dai salumi suini. In precedenza è stata ricordata la loro cinetica nel maiale e che le ocratossine (soprattutto la a) presenti nei vegetali (granaglie e derivati e bevande di largo consumo) rappresentano un rischio per l'uomo, mentre non vi sono specifici ed attendibili studi che quantifichino il ruolo delle carni suine quali cause di patologie umane, ed il maiale ha una funzione di "filtro", con almeno parziale attività protettiva. Si è anche ricordato che l'ocratossicosi delle carni suine é legato al tipo di alimento ed all'area geografica, e che nei paesi nei quali l'allevamento suino si basa su cereali quali il mais, come avviene per l'Italia, è da ritenere che il rischio ocratossicosi sia assente, se non molto limitato, mentre diverso può essere il caso di carni suine importate. Inoltre in Italia, considerando

anche il limitato consumo di carne fresca di maiale, non pare vi sia un significativo rischio da ocratossine, in confronto a quello derivante dall'uso d'alimenti vegetali contaminati (pane, birra, vino ecc.). Per evitare il rischio da ocratossina del consumatore, sarebbe sufficiente che i maiali, un mese prima della macellazione, ricevessero un'alimentazione con livelli d'ocratossina sufficientemente bassi.

Considerando i rischi da ocratossine nei salumi è necessario distinguere: 1 – salumi non stagionati con le ocratossine provenienti da carne e grasso (maiale), 2 – salumi stagionati con le ocratossine provenienti da carne e grasso (maiale) e, o da ammuffimenti di superficie (ambiente di stagionatura).

Per i rischi da ocratossine e salumi non stagionati è da rimarcare che le ocratossine possono trovarsi in salumi non stagionati prodotti con carni e grassi contaminati ed in questi casi un certo interesse potrebbe avere il prosciutto cotto ed analoghi, vista anche i quantitativi consumati, il rischio è analogo a quello delle carni fresche e pare molto limitato.

Per i rischi da ocratossine e salumi stagionati le ocratossine possono trovarsi in alimenti ammuffiti, non prodotti e conservati secondo buone pratiche, in particolare nei "salumi del contadino". Nei salumi a lunga stagionatura l'ocratossina prodotta dalle muffe di superficie penetra all'interno del prodotto con un gradiente che diminuisce del 50% per ogni mezzo centimetro di profondità. Da qui la difficoltà di un ricupero di alimenti con muffe produttrici di ocratossina, eliminando solo la parte superficiale. I rischi da ocratossine nei prosciutti stagionati la contaminazione da ocratossine può derivare dal maiale (vedi carni fresche) e da ammuffimenti della superficie. Importante è l'ammuffimento della superficie non protetta dalla pelle, dove si devono prospettare i seguenti interventi di controllo: 1 – ambientale (umidità, temperatura, presenza muffe ocratossigene ambientali); 2 – tecnologico (tempi e cicli di lavorazione "continua"); 3 – lieviti e lattici competitivi con le muffe ocratossigene. Per i rischi da ocratossine e salumi stagionati - salami a media - lunga stagionatura la contaminazione da ocratossine può derivare dal maiale (vedi carni fresche), ma soprattutto da ammuffimenti della superficie ed in proposito sono da considerare i seguenti intereventi di controllo: 1 – ambientale (umidità, temperatura, presenza muffe ocratossigene ambientali); 2 – tecnologico (tempi e cicli di lavorazione "continua"); 3 – lieviti e lattici competitivi con le muffe ocratossigene. Da non trascurare i rischi da ocratossine nelle spezie utilizzate nella preparazione dei salumi, in quanto le spezie (pepe, pistacchi, peperoncino ecc.) possono contenere micotossine e tra queste anche ocratossine, anche se le spezie possono rappresentare più un rischio psicologico che biologico, non sottovalutando che l'origine e la qualità sanitaria delle spezie presenta difficoltà nel controllo di filiera ed analitico peraltro comuni ad altri processi produttivi.

Per quanto riguarda la gestione del rischio salumiero da micotossine, il rischio biologico è da ritenere limitato, mentre il rischio psicologico non è da sottovalutare (anche per le spezie), ed è necessario un approccio integrato che considera la gestione della contaminazione da micotossine attraverso buone pratiche nella scelta delle carni (salumi non stagionati), buona pratica di fabbricazione e soprattutto di stagionatura. Dato che le micotossine sono metaboliti secondari tossici per gli animali superiori , prodotti da muffe che colonizzano gli alimenti, la formazione di micotossine è strettamente connessa alla crescita fungina e per prevenire la contaminazione da micotossine delle derrate, bisogna impedire la crescita fungina. Nella prevenzione occorre porre attenzione a: conoscere i fornitori e le loro fonti di approvvigionamento (purtroppo non sempre è possibile, ad esempio per le spezie); utilizzare la tecnica HACCP nella valutazione del processo produttivo; utilizzare piani di campionamento adeguati; utilizzare metodi d'analisi appropriati.

Per gli interventi di comunicazione è utile seguire lo schema d'interventi a matrice, come prospettati da Gray e coll., 1999 (vedi lo schema MATRICE DEGLI INTERVENTI).

The EFSA Journal (2006) 365, 1 - 56 Page 1 of 56

OPINION OF THE SCIENTIFIC PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN ON A REQUEST FROM THE COMMISSION RELATED TO OCHRATOXIN A IN FOOD

QUESTION N° EFSA-Q-2005-154 ADOPTED ON 4 APRIL 2006

Recent analyses of the dietary exposure of adult European consumers to OTA revealed that at present the weekly exposure ranges from 15 to 60 ng OTA per kg bodyweight per week, including high consumers of foods containing OTA.

This rate of exposure is below the TWI value of 120 ng/kg b.w. as derived by the Panel.

However, as current EFSA consumption databases do not include infants and children, the CONTAM Panel concluded that more data would be needed to assess exposure rates of this segment of consumers, taking into account their dietary preferences.

* * *

Contamination of animal feeds with OTA may result in the presence of residues in edible offal and blood serum, whereas the OTA contamination in meat, milk and eggs is negligible.

Despite efforts to reduce the amount of this mycotoxin in foods as consumed, a certain degree of contamination seems unavoidable at present.

MATRICE DEGLI INTERVENTI
(Gray e coll., 1999, con modifiche)

RISCHIO VALUTATO	RISCHIO PERCEPITO	
	BASSO	ALTO
BASSO	NESSUN INTERVENTO	INFORMARE ASSICURARE
ALTO	INTERVENIRE INFORMARE ALLERTARE	INFORMARE ACCORDO PRIORITÀ D'INTERVENTO

RIASSUNTO

La presentazione è articolata in due parti: nella prima sono sinteticamente considerate le attuali sfide della contaminazione da micotossine con particolare riguardo alla filiera della produzione suina e nella seconda parte sono approfonditi i principali aspetti della contaminazione da ocratossine nella fase della produzione salumiera.

La presenza e le patologie da micotossine nelle derrate animali sono un tema emergente che viene da lontano micotossine e micotossicosi, con problemi non nuovi, problemi conosciuti, mezzi di controllo disponibili e costituiscono tipici problemi di filiera. La Questione Micotossine e Micotossicosi nell'allevamento suino rappresentano Sette Sfide che operano nell'area della diversità e nell'area del rischio. Nell'area della diversità ricadono: 1 - questione biologica; 2 - questione ambientale e tecnologica; 3 - questione filiera. Nell'area del rischio: 4 - valutazione del rischio; 5 - gestione del rischio; 6 - percezione del rischio; 7 - comunicazione del rischio.

1 - Questione Biologica. Numerose sono le specie di miceti produttori di micotossine, numerose le micotossine, senza coerenza univoca tra specie e micotossine.

Principali muffe produttrici di micotossine che interesano l'allevamento suino sono le aflatossine e le ocratossine, senza dimenticare i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, il termogene, le ergoline. Attenzione oggi viene posta anche a micotossine come la citrinina e la sterigmatocistina.

2 - Questione Ambientale e Tecnologica. Produzione di micotossine e micotossicosi suine oggi si pongono tra agricoltura ed industria, in quanto l'ambiente condiziona: 1) lo sviluppo delle muffe; 2) la produzione di micotossine; 3) le tecniche di "risanamento", peraltro molto limitate

3 - Questione Filiera. Produzione della micotossine e micotossicosi sono tipici problemi di una filiera che considera: 1) produzione agricola campo; 2) conservazione e trasporto in silo; 3) mangimifici e loro silo; 4) allevamento e conservazione in silo: 5) allevamento con particolare riguardo al "filtro animale"; 6) trasformazione conservazione stagionatura delle carni suine; 7) fase del consumatore (dispensa e frigorifero domestico).

4 – Questione Valutazione del Rischio. Anche per micotossine e micotossicosi bisogna partire dalla distinzione tra pericolo e rischio. Pericolo è la capacità che un composto, oggetto, entità biologica (tossina, batterio o virus ecc.) di provocare un danno. Rischio è la probabilità che un pericolo provochi un danno, in un periodo di tempo definito (il rischio dev'essere espresso in termini numerici). Nella valutazione del rischio, *il rischio dev'essere valutato in modo obiettivo ed espresso in termini numerici,* senza tuttavia dimenticare il necessario *principio di precauzione*. Nella valutazione del rischio micotossine in suinicoltura bisogna sottolineare i passaggi dal rischio di settore al rischio di filiera, dal rischio zootecnico al rischio per la salute umana, dal rischio tossico al rischio cancerogeno. Nella valutazione del rischio diviene importante la questione dei limiti massimi tollerati che è stata individuata solo per alcune micotossine e singolarmente, non in eventuali associazioni, peraltro non rare. Per quanto riguarda la filiera suina bisogna ricordare i limiti posti per l'aflatossina B e l'Ocratossina negli alimenti per animali.

5 - Gestione del Rischio. Nella gestione del rischio gli interventi devono essere compiuti nei "punti critici" di produzione del rischio (campo, silo, trasformazione alimenti), con una gestione del rischio a livello di filiera effettuando un'auto-gestione ed un controllo pubblico.

6 - Percezione del Rischio. Oggi si ritiene possibile una valutazione scientifica della percezione del rischio, sia a livello pubblico che della gente comune, considerando che la percezione del rischio comprende la paura di pericoli che non sono noti, sono ritenuti possibili o solo od ipotizzati.

7 - Comunicazione del Rischio. Per superare la complessità della comunicazione del rischio alimentare bisogna porsi la domanda "qual é il problema del consumatore nella comunicazione del rischio?". In questo orientamento *la comunicazione è un processo essenziale di trasmissione di significati tra individui* e consiste nello scambiare o fornire informazioni al fine d'informare, o persuadere od allertare qualcuno sui rischi per la salute. Bisogna inoltre ricordare che nella valutazione e accettazione di un rischio da parte della popolazione è molto importante come il rischio è percepito ed a questo riguardo è necessario distinguere il rischio obiettivo dal rischio percepito (soggettivo). Inoltre, dalla informazione passiva è necessario passare alla partecipazione attiva, nella quale vi è un ruolo ruolo dell'industria e della distribuzione, dal controllo alla partecipazione, dall'infomazione all'educazione, dalla sicurezza biologica alla sicurezza psicologica.

Ocratossine nelle produzioni salumiere. I maggiori rischi dell'uomo da ocratossine derivano dagli alimenti vegetali che sono assunti nell'alimentazione (cereali, ma anche caffè, cioccolato ed altri cibi, uva rossa) e loro derivati (birra, vini rossi, uva passita ecc.). Circa le carni suine é necessario sottolineare che il problema dell'ocratossicosi è legato al tipo

d'alimento (orzo, frumento ed anche segale) ed all'area geografica (Balcani, paesi dell'Europa centrale e dell'est europeo come Polonia e Repubblica Ceca e Slovacchia, paesi dell'Europa settentrionale e soprattutto Danimarca). Nei paesi nei quali l'allevamento suino si basa su cereali quali il mais, come avviene per l'Italia, è da ritenere che il rischio ocratossicosi sia assente, se non molto limitato. Diverso può essere il caso di carni suine importate. Inoltre è da ricordare che le ocratossine possono trovarsi in preparazioni salumiere nelle quali, durante la preparazione, si siano sviluppate muffe produttrici di ocratossine, quindi non prodotti e conservati secondo le buone pratiche, il che può avvenire soprattutto nelle produzioni casalinghe. In queste condizioni l'ocratossina ha la possibilità di penetrare all'interno dell'alimento, con un gradiente che diminuisce del 50% per ogni mezzo centimetro di profondità. Da qui la difficoltà di un ricupero di alimenti con muffe produttrici di ocratossina, eliminando solo la parte superficiale. Per quanto riguarda le produzioni industriali sono allo studio sistemi di controllo dello sviluppo in superficie delle muffe ocratossigene, con particolare riguardo all'uso di lieviti che agiscono con meccanismi competitivi di diverso genere.

CITAZIONI BIBLIOGRAFICHE SULL'OCRATOSSICOSI SUINA

Bauer J., Gareis M., Gedek B. - Detection and occurrence of ochratoxin A in the tissues of slaughter swine - Berl. Munch. Tier Woch., 97, 279 - 283, 1984

Elling F. - Feeding experiments with ochratoxin A-contaminated barley to bacon bigs. 4. Renal lesions - Acta Agric. Scan., 33, 153 - 159, 1983

Elling F. - Mycotoxic nephropathy in swine - Dansk Veter., 62, 14 - 17, 1979

Escher F. E., Koehler P. E., Ayres J C. – Appl. Microb. – 26, 27, 1978

Frohlich A. A., Marquardt R. R., Clarke J. R. - Enzymatic and immunological approaches for the quantitation and confirmation of ochratoxin A in swine kidneys - J. Food Protect., 60, 172 - 1997.

Fukal L. - Spontaneous occurrence of ochratoxin A risidues in Czechoslovak slaughter pigs determined by immunoassay - Deut. Lebens. Rund., 87, 316 - 1991

Gareis M., Wolff J. - Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxin in food of aninal origin - Micoses, suppl. 1, 79 - 83, 2000

Golinski P., Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J. et alii - Med. Wet., 42, 46 - 48, 1986

Golinski P., Hult K., Grabarkiewicz-Szczesna J. et alii - Appl. Env. Microb., 49, 1014 - 1015,1985

Holmberg T., Hagelberg S., Lundeheim N. et alii - Ochratoxin A in swine blood used for evaluation of cereal handling procedures - J. Vet. Med., 37, 97 - 105, 1990

Hult K., Chelkowski J. - Occurrence of ochratoxin A in swine blood as an indicator of mold activity in cereal grain - Develop. Food Sci., p. 297-309, 1991

IARC – IARK monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, 56, 1993

Jarczyk A., Jedrychowski L., Wroblewska B. et alii - The estimation of contamination levels with fungi and ochratoxin A in grains and mixed meals for swine in north-east Poland - Pol. J. Food Nutr. Sci, 7, 631 - 644, 1998

Krogh P. - Ocrhratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropaty - Nord. Vet. 29, 402 - 405, 1977

Krogh P., Axelsen N. H., Elling F. et alii - Experimental porcine nephropaty. Changes of renal function and structuyre induced by ochratoxin A-contaminated feed - Acta Pathol. Mircob., Scand., suppl N. 246, 1974

Krogh P., Elling F., Gyrd-Hansen N. et alii - Experimental porcine nephropaty: changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. - Acta Path Microb., Scand, 84A, 429 - 434, 1976

Krogh P., Elling F., Hald B. et alii - Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs - Toxicol., 6, 235 - 242, 1976
Kryschanoffsky G. - Porcine nephropaty (mould nephrosis) - Dansk Vet. 71, 2 - 8, 1988
Labie Ch., Tache S. – Bull. Acad. Vet. France – 52, 553, 1979
Lawlor P. G., Lynch P. B. - Mycotoxin in pig feed - 2: Clinical aspects - Irish Vet. J., 54, 172 - 176, 2001
Li S., Marquardt R. R., Frohlich A. A. et alii - Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats - Toxicol. And Appl. Pharmac., 145 - 82 - 90, 1997
Lusky K:, Tesch D., Gobel R. et alii – Fleischwirtsch, 74, 558, 1994
Madsen A., Hald B., Mortensen H. P. - Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs - Acta Agric. Scand., 33, 171 - 175, 1983
Marquardt R. R., Frohlich A. A., - J. Anim. Sci., 70, 3968, 1992
Micco C., Ambruzzi M. A., Miraglia M., Brera C., Onori R., Benelli L. - Contamination of human milk with ochratoxina A, - IARC - *Sci Publ*, 115, 105-108, 1991
Micco C., Miraglia M., Brera C., Corneli S., Ambruzzi A., Evaluation of ochratoxin A in human milk in Italy - *Food Addit Contam*, 12**,** 351-4, 1995,
Muller G., Kielstein P., Rosner H. et alii - Do mycotoxin impair immune and defense reactions in pigs? - Prokt. Tier., 81, 932 - 936, 939 - 940,2000
Pepeljnjak S., Cvetnic Z. - The mycotoxicological chain and contamination of food by ochratoxin A in the nephropatic and non nephropatic areas in Yugoslavia - Mycopathologia, 90, 147 - 153, 1985
Pietri A., Bertuzzi t., Pallaroni L., e Piva G. - Occurence of ochratoxin A in Italian wines - Food Additives and Contaminants, 18, 547-654, 2001
Piva G - Comunicazione personale, 2001
Piva G, Pietri A., -Comunicazione personale, 2001
Roschentaler R., Creppy E. E., Dirheimer G. – J. Toxicol. – Toxin Rev., 3, 53, 1984
Rutqvist L., Bjorklund N. E., Hult K. Et alii - Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs - App. Env. Microb., 36, 920 - 925, 1978
Scheuer R. – Fleischwirtsch – 69, 1400, 1989
Tapia M. O., Seawright A., A. - Experimental ochratoxicosis A in pigs - Austr. Vet. J., 62, 210 - 222, 1984

Vétoquinol-Ascor Chimici:
le Dimensioni
della nostra passione

"Gli uomini si capiscono solo nella misura in cui sono animati dalle stesse passioni." (Stendhal)

- **Specialità medicinali veterinarie**
- **Medicinali veterinari polveri solubili e soluzioni orali**
- **Premiscele per alimenti medicamentosi**

Vétoquinol incarna la nostra passione.

Vétoquinol
Signe de Passion
ASCOR CHIMICI srl
filiale Gruppo Vétoquinol

ATTI DEL XXXVI MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA: INFLUENZA A/H1N1: STATO DELL'ARTE

Montichiari (BS), 25-26 marzo 2010

I SUINI E L'INFLUENZA PANDEMICA: MITI CONTRO FATTI

VAN REETH K., VAN POUCKE S., DE VLEESCHAUWER A.

Laboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Gent, Belgium

Introduzione: la natura dei virus influenzali

I virus influenzali tipo A sono virus con envelope, a RNA a singola elica appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae*. Sono ulteriormente classificati in sottotipi sulla base delle proprietà antigeniche delle glicoproteine esterne: emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA). Fino ad ora sono state identificate 16 HA antigenicamente differenti (H1-H16) e 9 diverse NA (N1-N9), ed è la loro combinazione che designa il sottotipo del virus. L'influenza è il classico esempio di virus geneticamente instabile e subisce "drift" e "shift" antigenici. Il drift antigenico comporta il graduale accumulo di piccole mutazioni nel genoma virale, in particolare nei geni che codificano per HA e /o NA. Questo può esitare in piccole variazioni antigeniche, che portano a un diminuito riconoscimento del virus da parte del sistema immunitario e quindi a maggiori probabilità di un'epidemia influenzale. Lo shift antigenico è un cambiamento molto più drammatico e si riferisce alla comparsa di un nuovo ceppo virale con HA e/o NA appartenente a un sottotipo diverso da quelli comunemente circolanti. Gli shift antigenici avvengono principalmente attraverso due meccanismi: la trasmissione diretta di un nuovo virus da un serbatoio animale, o il "riassortimento" genetico. Quest'ultimo si può verificare quando due diversi virus influenzali infettano contemporaneamente le cellule dell'ospite. Il genoma di un virus influenzale è "segmentato" – comprende 8 segmenti di RNA a singolo filamento e senso negativo - e gli 8 segmenti genetici di un virus possono poi mescolarsi e combinarsi con quelli di un altro virus, formandone uno nuovo. Ma sono 254 le possibili combinazioni di geni e uno shift è efficiente solamente se il riassortimento implica un cambiamento nella HA e/o nella NA. Quando un virus influenzale con queste caratteristiche entra nella popolazione umana, può superare l'immunità esistente e diffondersi in tutto il mondo causando una pandemia.

I virus dell'influenza tipo A infettano gli esseri umani e diversi animali come suini, cavalli, foche, furetti e una varietà di specie di uccelli selvatici e domestici. Gli uccelli selvatici acquatici sono considerati la fonte di tutti i virus influenzali nelle altre specie. Gli uccelli differiscono dai mammiferi in quanto sono sensibili ai virus influenzali appartenenti a qualsiasi sottotipo H o N e in quanto il virus influenzale si può replicare sia a livello del loro apparato respiratorio che nel tratto intestinale. Periodicamente, i virus influenzali vengono introdotti dagli uccelli selvatici in specie domestiche (polli, tacchini, quaglie), nelle quali si conoscono due fenotipi influenzali: a bassa patogenicità e ad alta patogenicità. A differenza dei virus a bassa patogenicità, i virus altamente patogeni causano un'infezione generalizzata che coinvolge tutti gli organi vitali fino a provocare una mortalità del 100%. I virus altamente patogeni sono stati limitati ai sottotipi H5 e H7, ma non tutti i virus H5 e H7 sono ad alta patogenicità. I virus dell'influenza aviaria altamente patogena sembrano aver origine nel pollame come risultato di mutazioni nella HA virale dopo l'introduzione di sottotipi H5 o H7 a bassa patogenicità da uccelli selvatici.

La patogenesi e i sintomi clinici di influenza sono molto simili nell'uomo e nei suini. Infatti in entrambi il virus replica nelle cellule epiteliali di tutto il tratto respiratorio, in particolare a livello di mucosa nasale, trachea e polmoni. L'infezione e la malattia sono alquanto transitorie, e l'escrezione del virus rilevata nei tamponi nasali e la replicazione del virus nei

polmoni durano al massimo 6-7 giorni. Anche se il virus non è in grado di replicare al di fuori del tratto respiratorio, la malattia è associata ad una varietà di sintomi sistemici. I tipici focolai di influenza suina (SI) sono caratterizzati infatti da una rapida comparsa di febbre alta, apatia, perdita di appetito, respirazione addominale faticosa e tosse. I segni classici dell'influenza umana comprendono febbre, brividi, tosse, cefalea, mialgia, malessere, anoressia e mal di gola. Tuttavia, le infezioni asintomatiche sono comuni in entrambe le specie, e i suini in particolare, si infettano spesso con virus 'influenzali suini (SIV), senza mostrare alcuna sintomatologia clinica. I virus influenzali sono potenti induttori di citochine infiammatorie a livello locale nel tratto respiratorio. Tra queste citochine ci sono ad esempio interferone, tumor necrosis factor-alfa, interleuchina-1 e -6, e diverse chemochine. È ormai chiaro che queste citochine sono importanti mediatori dei sintomi simil-influenzali nei suini così come nell'uomo. Ma le stesse citochine sono probabilmente anche responsabili della risposta immunitaria estremamente rapida e solida nei confronti dei virus influenzali.

Rispetto ad altri ospiti del virus influenzale, i suini sono più simili all'uomo anche per quanto riguarda la natura e le origini dei loro virus influenzali, e gli stessi sottotipi virali - H1N1, H3N2 e H1N2 – stanno circolando sia negli esseri umani che nei suini. Ciononostante, anche se i virus influenzali di uomo e suini spesso hanno una comune origine, non sono però identici al 100% dal punto di vista antigenico e genetico. Inoltre, i SIV europei differiscono in modo significativo nella loro struttura antigenica e genetica da quelli che circolano in nord America, ed anche da altre varianti che circolano in vari paesi asiatici. I virus influenzali H1N1 predominanti in Europa, per esempio, sono interamente di origine aviare e sono stati introdotti da anatre selvatiche nella popolazione suina nel 1979 e non sono correlati al virus H1N1 umano responsabile dell'influenza stagionale. In nord America invece stanno circolando due tipi di H1N1. I virus H1N1 cosiddetti "classici" erano presenti sin dagli inizi del ventesimo secolo e probabilmente si sono originati dal trasferimento del virus pandemico umano del 1918 ai suini. Questi virus suini H1N1 hanno quindi un'origine simile ai virus H1N1 della stagionale umana, nonostante questi ultimi abbiano mostrato un'evoluzione diversa e fondamentalmente più rapida. Il secondo tipo di virus H1N1 nord americani sono i cosiddetti riassortanti, possiedono infatti le glicoproteine di superficie del virus H1N1 "classico" e le proteine interne di virus H3N2 e H1N2 più recenti. Questi virus definiti "tripli riassortanti" sono importanti progenitori dell'attuale virus H1N1 pandemico, come sarà spiegato successivamente. Va sottolineato in questa sede che la maggior parte dei virus influenzali suini sono il risultato di un riassortimento genetico e che i loro geni sono derivati da geni di virus umani e/o aviari e/o suini.
I virus appartenenti ai sottotipi H3N2 e H1N2, hanno anch'essi una storia e una conformazione diversa in Europa e negli USA, ma discuterne in modo approfondito va oltre la scopo di questo articolo.
Possiamo però concludere che l'epidemiologia e l'evoluzione dei virus influenzali nei suini sono estremamente complesse e che, a differenza dei virus dell'influenza umana, appaiono differenti nelle diverse regioni del mondo.

Pandemie influenzali del ventesimo secolo e il presunto ruolo dei suini
In teoria, i virus dell'influenza pandemica, per essere considerati tali, devono avere: un sottotipo di HA nuovo, nei confronti del quale la popolazione umana non abbia alcuna immunità, la capacità di causare una patologia grave nell'uomo e, soprattutto, la prerogativa di trasmettersi in modo efficiente da uomo a uomo. L'introduzione di un virus influenzale nuovo nella popolazione umana di per sé non è sufficiente ad avviare una pandemia umana, perché il virus deve subire alterazioni genetiche - o da mutazioni o da riassortimento genetico

- per potersi replicare e trasmettere in modo efficiente negli esseri umani.
Nel corso del ventesimo secolo si sono verificate tre pandemie influenzali: l'influenza spagnola (H1N1) del 1918, l'influenza asiatica (H2N2) del 1957 e l'influenza di Hong Kong (H3N2) del 1968.

La pandemia di influenza spagnola è stata la più grave e ha ucciso più persone, almeno 20 milioni, della Prima Guerra Mondiale. Le prime osservazioni cliniche di influenza suina sono state riferite anche a quel tempo e i ricercatori sono stati colpiti dalle somiglianze cliniche e patologiche dell'influenza umana e di quella suina nel 1918. Anni dopo, le analisi filogenetiche hanno indicato che i virus influenzali suini e umani del 1918/1919 erano geneticamente simili e probabilmente hanno avuto origine da un antenato comune. L'ipotesi più diffusa è che il virus abbia fatto un salto di specie, dai volatili all'uomo, poco prima dell'inizio della pandemia. Ma alcuni ricercatori hanno recentemente messo in discussione questa ipotesi. Essi sostengono infatti che il virus si sia evoluto nelle persone o nei suini per un periodo di tempo indeterminato prima dell'inizio della epidemia e che molto probabilmente si trattava di un riassortante e non di un virus di origine solamente aviare. A causa della mancanza di sequenze di virus influenzali suini e di altri virus influenzali di quel periodo, l'esatta origine del virus del 1918 resterà probabilmente controversa e forse non sapremo mai se il primo virus ebbe origine nell'uomo o nei suini.

Entrambe le epidemie del 1957 e del 1968 sono state invece causate da virus originati del riassortimento tra il virus dell'influenza umana circolante in quel periodo e un virus aviare che ha fornito una nuova HA e un altro, forse altri due, geni. Per molti anni si è creduto che il riassortimento non avvenisse direttamente nell'uomo, ma nei suini, che servivano da ospite intermedio per trasferire poi il virus agli esseri umani. I libri di testo continuano a citare questa ipotesi, ma non c'è in realtà nessuna prova diretta del ruolo dei suini nella genesi delle pandemie del 1957 e del 1968. Perché, allora, sono stati accusati i suini così a lungo? Gran parte dell'ipotesi si è basata su studi sperimentali degli anni '80 e '90 e su dati epidemiologici a partire da quel periodo. Una scoperta fondamentale fu quella che i riassortanti tra virus influenzali umani e aviari hanno spesso origine nel suino. La nozione che il suino fosse un mixing vessel unico nel suo genere, per questi virus fu ulteriormente avvalorata dalla scoperta, nel 1998, che le cellule epiteliali della trachea del suino contengono sia recettori per i virus umani sia per quelli aviari. Fu anche dimostrato che la continua replicazione di un virus aviare nei suini in natura può portare alla formazione di varianti che, preferenzialmente, riconoscono i recettori di tipo umano e che sono quindi più facilmente adattabili alla replicazione nell'uomo. Inoltre, in passato l'infezione umana da virus influenzali provenienti da specie aviari sembrava essere estremamente rara, con solo 3 casi segnalati dal 1959 al 1996. D'altra parte, a partire dagli anni '50, era invece stata dimostrata la trasmissione dei virus influenzali suini agli esseri umani in diverse occasioni. Tutto questo ha così portato al dogma che i suini siano gli unici sensibili a entrambi i virus aviari e umani e che fungano da mixing vessel e da ospiti intermedi per la trasmissione del virus dell'influenza aviare all'l'uomo. Il paragrafo successivo chiarirà perché molte di queste vecchie teorie siano ormai da considerarsi superate.

Focolai di influenza aviare H5N1 ad alta patogenicità: un allarme pandemia
Dal 2003, i focolai di influenza aviare H5N1 sono stati segnalati nel pollame in molti paesi in vari continenti, tra cui Asia, Africa ed Europa. Questi sono i focolai più grandi e più devastanti da virus influenzali aviari ad alta patogenicità nella storia, e milioni di

polli e anatre sono stati abbattuti con un costo economico elevato. In totale 467 infezioni umane da virus H5N1 sono state segnalate dalla Organizzazione Mondiale della Sanità a partire dall'inizio dei focolai nel 2003 fino a dicembre 2009, e 282 di questi sono stati mortali. Questo tasso di mortalità eccezionalmente alto è probabilmente dovuto a una massiccia replicazione del virus H5N1 nei polmoni degli esseri umani, che si traduce in una "tempesta di citochine" e in una sindrome da distress respiratorio acuto. Tuttavia, il numero totale delle infezioni umane rimane basso rispetto al numero di capi di pollame infettati. La maggior parte, se non tutti, i casi umani si sono verificati in persone a stretto contatto con pollame infetto e direttamente esposte a grandi quantità di virus H5N1, mettendo così in discussione l'ipotesi così popolare che vede nel suino un ospite intermedio necessario. Fortunatamente, il virus non si è adattato alla trasmissione interumana e questo è uno dei principali motivi grazie al quale non ha causato alcuna pandemia.

I suini possono infettarsi e vengono infettati con il virus H5N1 in condizioni naturali e sperimentali, ma tutti i dati indicano che i virus H5N1 attualmente in circolazione non sono ben adattati alla replicazione nei suini. L'incidenza di infezione da virus H5N1 nei suini in Asia è rimasta molto bassa, anche in zone dove il virus rimane endemico nel pollame. I pochi studi disponibili di infezioni sperimentali indicano che il virus H5N1 replica nel tratto respiratorio dei suini, ma in misura molto inferiore rispetto ai SIV tipici e principalmente nei polmoni. Incredibilmente, i suini hanno mostrato solo lievi o assenti sintomi clinici, mentre i virus sono risultati estremamente virulenti per il pollame. Inoltre, i suini infettati non hanno trasmesso il virus agli altri suini di nidiate non infette. Purtroppo, tutti questi studi hanno coinvolto un numero molto esiguo di suini e un numero limitato di esami, situazioni tipiche di infezioni sperimentali di suini in condizioni di un livello di biosicurezza-3.

Nel nostro laboratorio, abbiamo effettuato uno studio approfondito della patogenesi nei suini con un virus influenzale aviare H5N2 a bassa patogenicità. Questo virus è strutturalmente molto simile al virus H5N1 menzionato precedentemente, ma non è pericoloso per il pollame o per l'uomo. Abbiamo confrontato l'estensione e i siti di replicazione del virus aviare H5N2 all'interno dell'organismo, con quelli di un virus suino H1N1 enzootico in Europa. Entrambi i virus hanno mostrato un simile tropismo d'organo e una simile durata d'infezione: sono stati rilevati nelle cellule epiteliali lungo l'intero tratto respiratorio del suino, e soprattutto nei polmoni, per 6 giorni consecutivi dopo l'inoculazione intranasale. Il virus aviare, tuttavia, ha infettato proporzionalmente meno cellule rispetto al virus suino a tutti i livelli del tratto respiratorio. Come risultato di ciò, la cavità nasale, che è un grande portale d'ingresso per i virus influenzali, è apparsa estremamente difficile da infettare da parte del virus influenzale aviare. Questa scoperta potrebbe spiegare sia perché i suini necessitino apparentemente di un'esposizione a dosi elevate di virus aviare per essere infettati, sia perché abbiano una quantità inferiore di virus nelle secrezioni nasali dopo infezione sperimentale, ed anche perché sia così difficile per il virus dell'influenza aviare diffondere tra i suini.

Abbiamo inoltre confrontato la capacità di replicazione di vari virus influenzali suini e aviari in vitro, utilizzando colture di organi respiratori di suino. A questo sono stati affiancati studi dettagliati sull'espressione dei recettori per il virus influenzale lungo le intere vie respiratorie sia alte che basse. Come nelle infezioni sperimentali dei suini, i virus aviari sono stati fortemente ostacolati nella loro replicazione, in particolare nel naso e trachea, ma hanno iniziato a replicare meglio nei bronchioli e nei polmoni. La preferenza dei virus aviari per i polmoni corrisponde all'espressione dei recettori per il virus influenzale. Il recettore "umano", che viene anche utilizzato da SIV, è stato trovato nelle vie aeree

superiori e inferiori, il recettore "aviare" è stato quasi esclusivamente rilevato nei polmoni. In netto contrasto con le convinzioni precedenti, si è ora d'accordo sul fatto che anche le vie respiratorie umane contengano entrambi i tipi di recettori. Il recettore aviare, tuttavia, è stato trovato solo in profondità nei polmoni, il sito preferenziale di replicazione per i virus dell'influenza aviare nell'uomo, come nei suini. Tutto questo coincide con la recente scoperta che il riassortimento genetico possa verificarsi anche negli esseri umani, e non solo nei suini. In poche parole: il suino può essere meno diverso e molto più simile all'uomo di quanto si pensi. Complessivamente i virus dell'influenza aviaria sono chiaramente ostacolati nella loro replicazione sia nell'uomo che nel suino. Le mutazioni genetiche che sono necessarie per l'adattamento ai mammiferi possono ancora verificarsi nel suino, ma potrebbero anche avvenire nell'uomo o anche in alcune specie di uccelli.

Una nuova pandemia che non è influenza aviaria: il nuovo virus influenzale di origine suina

Mentre molti temevano una pandemia di influenza aviaria H5N1 con origine in Asia, la prima pandemia dopo 41 anni è stata causata da un virus influenzale di origine suina, ed ha avuto inizio in Nord America. Contro tutte le aspettative, questo nuovo virus H1N1 appartiene a un sottotipo che ha circolato nella popolazione umana dal 1918 al 1957 e ancora dal 1977 fino ad oggi. Inoltre il nuovo virus H1N1 differisce radicalmente dal virus H1N1 dell'influenza stagionale umana, ed è un riassortante di almeno due SIV circolanti. Sei segmenti genetici sono simili a quelli riscontrati precedentemente in SIV tripli-riassortanti circolanti nei suini in Nord America, dai quali il virus pandemico ha acquisito la HA dell'H1 classico. Questi virus suini avevano già un mix di geni di origine aviaria, umana e suina. Il secondo virus, dal quale sono derivati i geni che codificano per la N1 e per la matrice, sta circolando nella popolazione suina in Europa e in Asia.

È noto da tempo che i virus dell'influenza suina sporadicamente passano all'uomo. Ci sono circa 70 casi documentati di influenza suina negli esseri umani dal 1958. Quasi tutti i genotipi di SIV nordamericani o europei conosciuti sono stati occasionalmente isolati dagli esseri umani. La maggior parte di queste persone aveva stretti contatti con suini e la malattia nell'uomo era di solito clinicamente simile alla malattia causata da infezioni dai virus influenzali umani. Alcuni casi sono stati mortali, ma sono avvenuti principalmente in persone con patologie preesistenti. È importante sottolineare invece che, fino ad ora, a tutti i SIV mancava la capacità fondamentale di diffondere nella popolazione umana, ed è stata questa la grande differenza rispetto al nuovo virus pandemico H1N1 del 2009. Deve anche essere chiaro che il numero totale di casi di comprovata SIV negli esseri umani rimane inferiore al numero totale di persone con esposizione professionale ai suini. Studi sierologici, d'altra parte, suggeriscono che questi pochi casi documentati siano solo la punta di un iceberg. Questi studi hanno rilevato costantemente tassi di sieroprevalenza superiori e titoli anticorpali superiori nei confronti dei SIV in coloro che lavorano con i suini rispetto ai gruppi di controlli di non esposti ai suini. Purtroppo, l'interpretazione di tali studi, resta molto difficile: i titoli elevati di anticorpi non sono necessariamente il risultato di un'infezione da SIV, data la possibilità di una parziale cross-reattività sierologica tra virus influenzali umani e suini dello stesso sottotipo nei test sierologici utilizzati. Una certezza, quindi, rimane solo che la reale incidenza della influenza suina nell'uomo non è nota.

Anche se il virus pandemico H1N1 del 2009 quasi sicuramente proviene dai suini, rimane ancora un mistero come, quando e dove abbia avuto origine. Prima del sua identificazione negli

esseri umani, nella primavera del 2009, questo specifico virus non era mai stato rilevato nei suini. Tuttavia la sorveglianza per l'influenza nei suini è limitata, e il virus ha probabilmente circolato inosservato. In ogni caso, il nuovo virus H1N1 è stato quasi certamente assente nelle popolazioni europee di suini in passato, dato che la "European Surveillance Network for Influenza in Pigs" che è stata operativa dal 2001-2008 non lo ha mai riportato. Diversi gruppi di ricerca nel campo dell'influenza suina sono stati scelti per condurre infezioni sperimentali di suini con il nuovo virus H1N1, subito dopo che la sua origine suina è diventata una certezza. Questi studi hanno dimostrato all'unanimità che il virus è infettivo per i suini e si diffonde rapidamente nella popolazione suina utilizzata per la sperimentazione. Il virus sembra comportarsi quasi esattamente come i SIV enzootici. Da metà maggio 2009 fino ad ora, sono stati riportati casi sporadici del nuovo virus H1N1 negli allevamenti suini in un totale di 20 paesi, tra cui Irlanda del Nord, Regno Unito, Norvegia, Islanda, Finlandia, Italia, Germania e Danimarca. I suini sembrano essere stati infettati da esseri umani infetti, e non vi è alcuna prova finora che il suino stia avendo un ruolo nella epidemiologia o nella diffusione a livello mondiale del virus nella popolazione umana. Resta da vedere se il nuovo virus H1N1 diventerà comune nelle popolazioni di suini. Una questione cruciale è se l'immunità per i virus influenzali suini enzootici possa proteggerli contro questo nuovo virus.

Per valutare in modo preliminare se popolazione suina europea sia completamente sensibile al nuovo virus H1N1, sono stati esaminati sieri di suini, che erano stati infettati o vaccinati con SIV europei. I sieri sono stati testati per gli anticorpi nei confronti del nuovo virus H1N1, così come dei SIV che sono circolati in Nord America negli ultimi dieci anni. Tutti questi virus hanno la HA degli H1 classici che mostra un'identità di sequenza molto bassa (solo il 75% o meno) con la H1 dei SIV europei. I suini che avevano subito una singola infezione con un ceppo europeo H1N1 o H1N2 non avevano anticorpi per il nuovo virus H1N1 e per i virus nord americani. Al contrario, una cross-reattività sierologica è stata comunemente rilevata dopo infezioni consecutive con due diversi sottotipi europei o dopo vaccinazione con vaccini commerciali. Questi dati sierologici suggeriscono sia che i suini europei possono avere un'immunità parziale nei confronti del nuovo virus H1N1, sia che le probabilità che siano coinvolti in futuro nella diffusione del virus agli esseri umani possono essere inferiori a quello che generalmente si crede. Il passo successivo sarà quello di testare questa ipotesi in ben controllati studi sperimentali di challenge nei suini.

Nessuno può prevedere l'evoluzione del nuovo virus H1N1 e l'eventuale impatto della pandemia per gli esseri umani. Finora, il virus non è risultato essere per l'uomo più virulento dei virus responsabili dell'influenza stagionale e il tasso di mortalità è rimasto basso. Un altro fatto importante è che ci può essere un certo grado di immunità al virus pandemico nella popolazione umana. Il nuovo virus H1N1 è antigenicamente molto diverso da quelli dell'attuale influenza stagionale, ma è relativamente simile a virus H1N1 che hanno circolato nella popolazione umana fino agli anni '50. Ciò concorda con il riscontro che una parte consistente di persone oltre i 60 anni sembra avere anticorpi cross-reattivi per il nuovo virus H1N1, e ciò spiega probabilmente perché il virus abbia colpito più duramente i giovani rispetto agli anziani. Questo è solo uno dei motivi per cui la pandemia è rimasta relativamente poco grave. Oltre al fatto che, vaccini specifici contro questo nuovo virus sono stati sviluppati in un tempo molto breve e sono stati ampiamente utilizzati in diversi paesi europei.

Conclusioni

Diverse nuove scoperte riguardo la formazione di virus influenzali pandemici sono dovute ai focolai di H5N1 e alla comparsa del virus pandemico H1N1 del 2009. Entrambi i virus

hanno sminuito alcuni vecchi dogmi circa il ruolo dei suini nelle pandemie influenzali. È chiaramente un mito che i suini siano ospiti intermedi essenziali per la trasmissione dei virus dell'influenza aviaria all'uomo, o che siano l'unica specie animale con entrambi i recettori per i virus influenzali umani e aviari, o che il riassortimento genetico sia limitato solo al suino. D'altra parte, è vero che i suini sono spesso una piattaforma per il riassortimento e possono trasmettere i virus riassortanti all'uomo. Anche se, ovviamente, è un evento molto raro, vi è un pericolo reale che i riassortanti di origine suina inizino a diffondersi facilmente tra gli esseri umani e diano inizio ad una pandemia, e il nuovo virus H1N1 ne è la perfetta dimostrazione. Quello che ancora non sappiamo è cosa sia necessario per una replicazione efficiente nel suino ed un adattamento dei virus influenzali al suino stesso. Allo stesso modo, non si sa quali fattori scatenino la trasmissione dei virus influenzali dal suino all'uomo a livello fisiologico e molecolare, o ciò che è necessario per l'ulteriore trasmissione di tali virus tra gli esseri umani. Questi sono interrogativi complessi ma molto importanti che possono essere risolti solo attraverso la ricerca. Se combinata ad un implemento della sorveglianza per l'influenza negli animali, a vaccini ed antivirali efficaci, la comprensione di questi interrogativi è fondamentale per il controllo di future pandemie influenzali.

Bibliografia selezionata (lista completa disponibile presso l'autore)

1. Brookes SM, Irvine RM, Nunez A, Clifford D, Essen S, Brown IH, et al. Influenza A (H1N1) infection in pigs. Vet Record. 2009;164:760-1.
2. De Vleeschauwer A, Atanasova K, Van Borm S, van den Berg T, Rasmussen T, Uttenthal A, et al. Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. PLoS One. 2009; http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006662.
3. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science. 2009;325:197-201.
4. Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. J Clin Virol. 2009;45:174-8. http://www.esnip.ugent.be
5. Landolt GA, Olsen CW. Up to new tricks – a review of cross-species transmission of influenza A viruses. Anim Health Res Rev. 2007;8:1-21
6. Lange E, Kalthoff D, Blohm U, Teifke JP, Breithaupt A, Maresch C, et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. J Gen Virol. 2009. In press.
7. Lipatov AS, Kwon YK, Sarmento LV, Lager KM, Spackman E, Suarez DL, et al. Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. PloS Pathog. 2008;4:e1000102.
8. Ma W, Kahn RE, Richt JA. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. J Mol Genet Med. 2008;3:158-66.
9. Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. Clin Infect Dis. 2007;44:1084-8.
10. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. Respir Res. 2007;25:8-73.
11. Nicholls JM, Peiris JS. Avian influenza: update on pathogenesis and laboratory diagnosis. Respirology. 2008;13 Suppl 1:S14-8.
12. Olsen CW, Brown I, Easterday BC, Van Reeth K. Swine influenza. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D' Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of Swine, 9th edition.

Ames (IA): Iowa State University Press; 2006. p. 469-82.
13. Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. J Clin Virol. 2009;45:169-73.
14. Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:11709-12.
15. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. Vet Res. 2007;38:243-60.
16. Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs. Viral Immunol. 2002;15:583-94.
17. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Richt JA. Swine influenza viruses: a North American perspective. Adv Virus Res. 2008;72:127-54.
18. Wang TT, Palese P. Unraveling the mystery of swine influenza virus. Cell. 2009;137:983-5.
19. Kyriakis CS, Olsen CW, Carman S, Brown IH, Brookes SM, Van Doorsselaere J, Van Reeth K. Serologic cross-reactivity with pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, Europe. Emerg Infect Dis. 2010;16:96-9.

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

TAVOLA ROTONDA:
EFFETTO DEI CAMBIAMENTI CLIMATICI SULLA DIFFUSIONE DELLE MALATTIE

CAMBIAMENTI CLIMATICI: FATTI *VS* SPECULAZIONI

CARLO CACCIAMANI

Direttore Servizio IdroMeteoClima Arpa Emilia Romagna

1. INTRODUZIONE: IL CLIMA STA CAMBIANDO

Le intense anomalie climatiche verificatesi nel corso dell'ultimo decennio hanno unanimemente indotto la comunità scientifica ad ammettere l'esistenza di una modificazione del clima osservato, dovuta alle attività umane. Durante l'ultimo secolo, l'uomo ha provocato un profondo mutamento nella composizione dell'atmosfera terrestre per quanto riguarda specie chimiche che contribuiscono alla determinazione dell'equilibrio radiativo del nostro pianeta. Variazioni anche piccole nelle concentrazioni di "gas serra" possono modificare la forzatura radiativa del clima e l'equilibrio del sistema climatico terrestre sia a livello globale che a livello regionale. Dal IV report pubblicato nel 2007 dal WG1 dell'IPCC (www.ipcc.ch) emergono per l'intero pianeta alcune conclusioni che possono essere così riassunte:

- L'insieme crescente delle osservazioni disponibili presenta l'immagine di un mondo in via di generale riscaldamento con rilevanti evidenze di cambiamenti nel sistema climatico;
- Le emissioni di gas serra ed aerosol dovute alle attività umane continuano ad alterare l'atmosfera e ad influire sul clima;
- Nuove e più stringenti prove confermano che il riscaldamento osservato negli ultimi 50 anni si possa attribuire alle attività umane;
- L'uomo continuerà a modificare la composizione atmosferica per tutto il secolo 21°;
- Tutti gli scenari esaminati conducono ad un futuro stato del pianeta caratterizzato da un aumento globale delle temperature e del livello dei mari;
- Il cambiamento climatico dovuto all'attività umana persisterà per molti secoli.
- Anche applicando interventi di mitigazione per limitare il riscaldamento globale al di sotto dei 2°C rispetto al periodo pre-industriale dovranno essere comunque fronteggiati gli impatti dovuti al cambiamento climatico già in atto.

2. I CAMBIAMENTI A SCALA LOCALE

Il segnale di cambiamento è visibile anche alla scala locale: ad esempio alla scala del Nord Italia e dell'Emilia-Romagna si notano dei chiari segni di cambiamento sia per quanto concerne le temperature, sia per le piogge. Ad esempio, le temperature massime (Figura 1) mostrano un'evidente impennata dall'inizio degli anni '80 sino a tutt'oggi con una crescita dell'ordine di quasi 2°C in poco più di 40 anni (circa 0.5°C/10 anni). Tale segnale è visibile in tutte le stagioni. In particolare, durante la stagione estiva si osservano valori di temperatura massima sempre superiori ai valori di riferimento climatici. Per quanto concerne le precipitazioni (Figura 2) si denota una generale tendenza negativa che in realtà sembra essere dovuta, più che ad una graduale e costante diminuzione delle piogge in tutto il periodo, ad una diminuzione repentina del valor medio della distribuzione, avvenuta all'inizio degli anni '80; è infatti abbastanza evidente come il tipico andamento altalenante che evidenzia la variabilità inter-annuale si sia spostato al di sotto dei valori della media climatica trentennale (calcolata nel periodo di riferimento 1960-1990) a partire dall'inizio appunto degli anni ottanta.

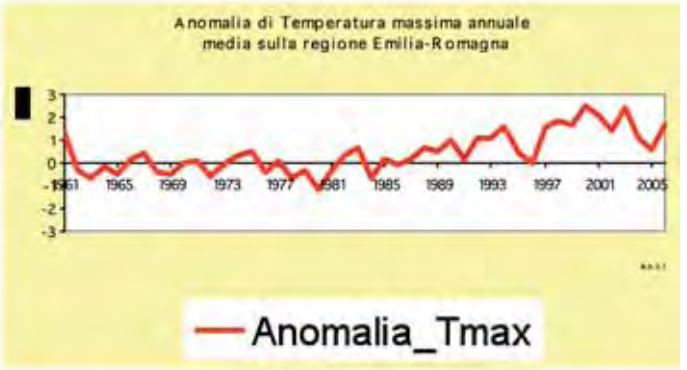


Figura 1: andamento delle temperature massime giornaliere (medie annuali) nel periodo 1961-2006. Media regionale calcolata su un insieme di circa 30 stazioni meteorologiche ubicate sul territorio regionale

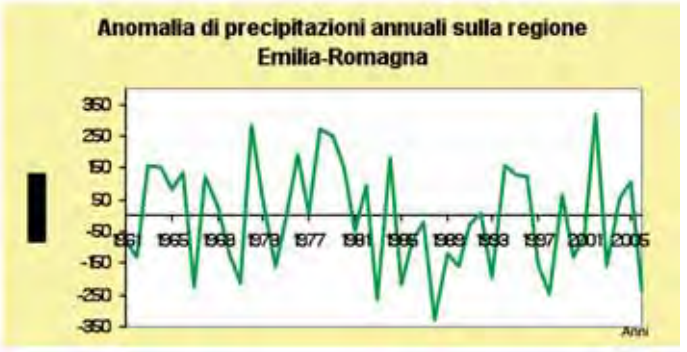


Figura 2: Andamento delle precipitazioni medie annuali in regione Emilia-Romagna. Media regionale calcolata su circa 100 stazioni pluviometriche.

3. GLI SCENARI CLIMATICI FUTURI

Per quanto riguarda lo studio degli scenari di cambiamento climatico futuro, gli strumenti modellistici globali sono il principale strumento a disposizione della comunità scientifica e hanno permesso di formulare degli scenari di cambiamento sempre più dettagliati, anche se sono sicuramente presenti molteplici cause di incertezza determinate da cause diverse. Al fine proprio di diminuire tali incertezze o quantomeno per definirle in maniera piu' quantitativa, recentemente è stato proposto un uso di "ensemble" delle diverse catene modellistiche, analogamente a quanto si attua già da tempo nel settore della previsione meteorologica. La valutazione delle potenzialità di un uso di "ensemble" dei GCMs è stato l'oggetto di un importante progetto europeo, denominato appunto ENSEMBLES (il sito del progetto è: http://ensembles-eu.metoffice.com), un importante IP project finanziato dalla Commissione Europea nell'ambito della sub-priorità "Global Change and Ecosystems" del sesto programma Quadro di ricerca e sviluppo. All'interno di ENSEMBLES è stata sviluppata ed utilizzata una aggiornata serie di strumenti modellistici. Le nuove simulazioni globali prodotte sono state poi opportunamente regionalizzate e infine utilizzate come input di molteplici studi e valutazioni di impatto, anch'essi sviluppati all'interno del progetto.

La conclusione principale di sintesi a cui ENSEMBLES giunge è che il ***continente europeo sarà interessato da una tangibile modifica del clima attuale nei prossimi decenni***. Uno dei risultati più solidi che sono scaturiti dal progetto Ensemble riguarda gli

scenari di cambiamento climatico prodotti sul continente europeo, per quanto concerne le temperature e le precipitazioni (Figura 3 e Figura 4 sotto riportate, estratta dal documento finale di progetto). Gli scenari sono riferiti al trentennio 2021-2050 rispetto al 1961-1990.

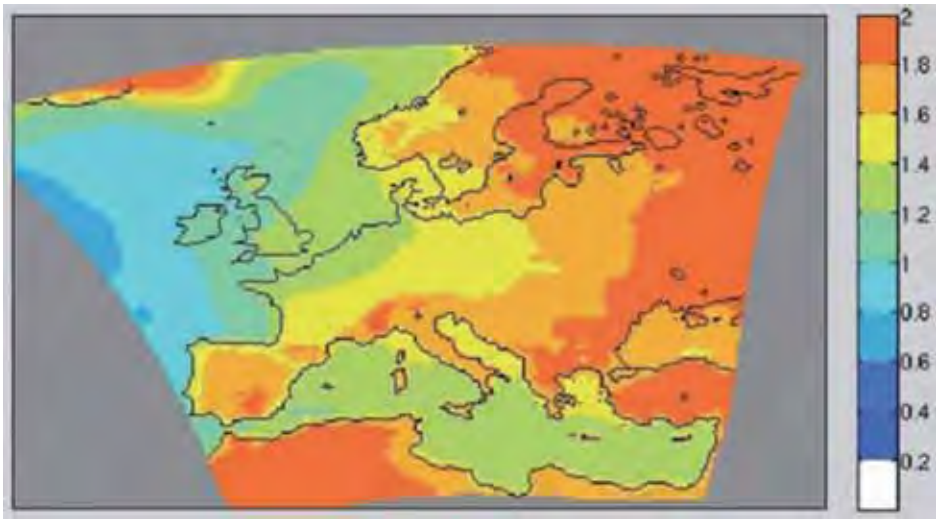


Figura 3: Segnale di cambiamento climatico (2021–2050 meno 1961–1990) per quanto riguarda la temperatura a due metri dal suolo. Media di 16 simulazioni di modelli regionali del clima

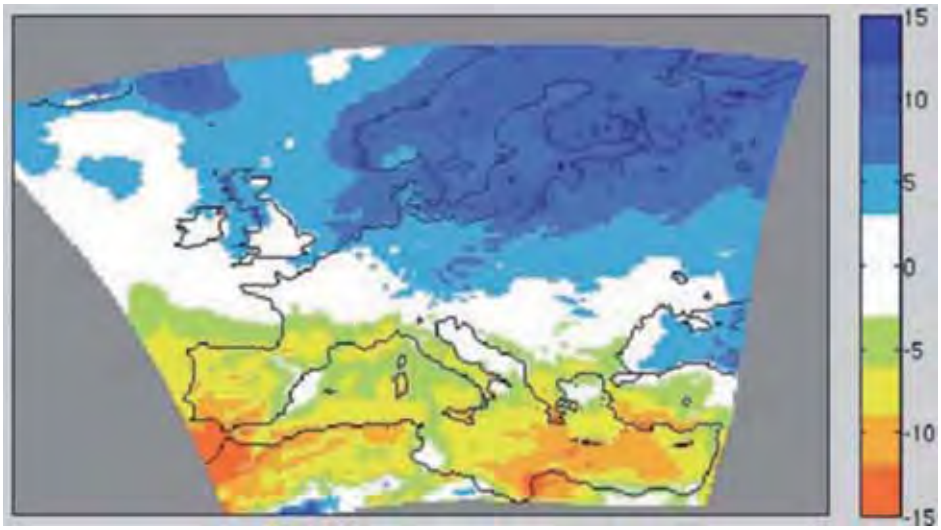


Figura 4: Segnale di cambiamento climatico (rapporto percentuale tra la media 2021–2050 e quella del trentennio) per quanto riguarda la precipitazione . Media di 16 simulazioni di modelli regionali del clima

E' da notare come il segnale di aumento termico sia omogeneo sulla gran parte del continente europeo con punte tra 1.5 e 2 °C e un'altrettanto evidente difformità di andamento tra Nord e Sud d'Europa per quanto concerne le precipitazioni, per le quali gli scenari mostrano un aumento in Nord Europa e una chiara diminuzione sul Mediterraneo. I risultati per la stagione estiva (figure non riportate) sono ancora più significativi e mostrano un ancor maggior aumento delle temperature e una diminuzione più significativa delle piogge nell'area mediterranea. Gli scenari riferiti all'ultimo trentennio 2071-2100 amplificano la portata di questi cambiamenti per queste due grandezze La modesta variabilità tra i diversi modelli è una misura della solidità delle simulazioni e fa crescere la credibilità dei segnali di cambiamento nell'Area Mediterranea, caratteristica questa non sempre riscontrabile in altre aree del pianeta. Da questo tipo di analisi emerge come siano presenti delle ampie zone europee con una forte coerenza nei *pattern* spaziali dei trend estivi e invernali delle temperature e precipitazioni e come siano allo stesso tempo anche presenti delle aree ampie in cui al contrario il segnale di cambiamento è poco significativo

L'uso di diverse metodologie di Statistical Downscaling (SD) ha reso possibile poi la definizione di scenari probabilistici di cambiamento a scale spaziali ancora più piccole, come ad esempio sotto-aree europee o addirittura piccole regioni amministrative. Le tecniche di SD si basano sulla definizione di set di predittori, estratti dai GCMs (ad esempio degli indici di circolazione in quota), che vengono connessi in modo statistico a dei "predittandi" (ad esempio le temperature al suolo).

I risultati ottenuti nell'area del Nord Italia ottenuti applicando una tecnica di SD a 6 modelli globali ([1]), sono mostrati nella Figura 5 ed evidenziano la struttura delle funzioni di distribuzione di probabilità, (*probability density function, pdf*) delle anomalie di Temperatura Massima estiva proiettate ai trentenni 2021-2050 e 2071-2100 (le anomalie sono sempre valutate rispetto al trentennio 1961-1990). E' ben visibile lo spostamento verso "destra" delle due funzioni di distribuzione, che nel periodo 2071-2100 ha il massimo centrato attorno a 4 gradi di aumento. E' da notare che lo spostamento della funzione di distribuzione implica non solo un cambiamento dei valori medi ma anche una maggiore probabilità di occorrenza dei valori estremi. Ad esempio se un'anomalia uguale o superiore a 2 gradi potrebbe avere più o meno un 50% di probabilità di accadere nel trentennio 2021-2050, la stessa anomalia potrebbe avere una probabilità superiore al 90% di accadere nell'ultimo trentennio 2071-2100. Parallelamente, se periodi molto caldi (ad esempio con anomalie positive di 4-5 gradi) sarebbero ancora giudicati come eventi quasi "rari" nel vicino trentennio 2021-2050, gli stessi risulterebbero essere nella norma alla fine del secolo. Analoghe tecniche sono state usate per definire degli scenari di precipitazione alla scala del Nord Italia ed anche nella regione Emilia-Romagna. I risultati mostrano, come elemento più rilevante, un chiaro segnale di diminuzione delle piogge estive ed un aumento degli eventi estremi. In sintesi, le caratteristiche più salienti che emergono dagli scenari di cambiamento ottenuti possono essere riassunte in: aumento generale delle temperature, in particolare delle massime estive, aumento dell'intensità e della durata delle "ondate di calore", diminuzione del numero di giorni di gelo nei periodi invernali, diminuzione delle precipitazioni, più sensibile nel periodo estivo. E' molto probabile anche un aumento dell'intensità delle precipitazioni di breve durata nel periodo primaverile-estivo che saranno alternate da più frequenti e lunghi eventi siccitosi.

1 elaborazioni svolte da ARPA, Servizio IdroMeteoClima Emilia-Romagna, partner del progetto Ensembles

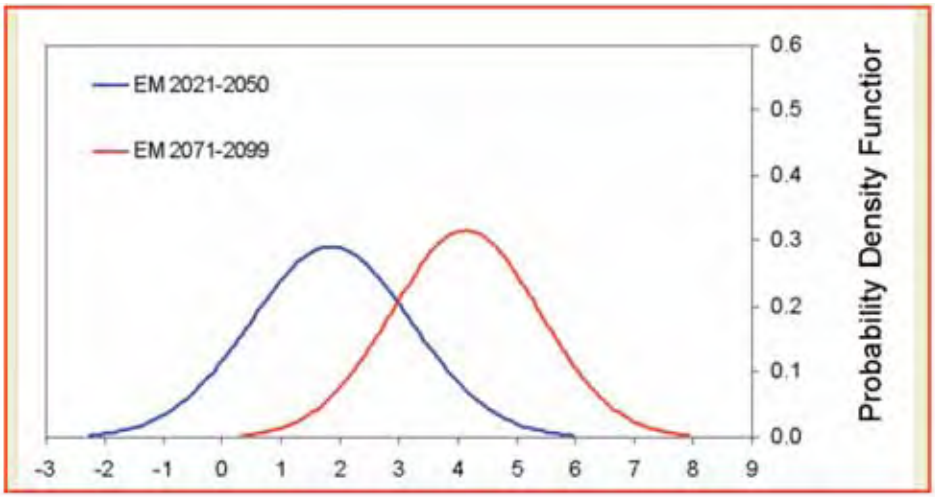


Figura 5: Cambiamenti della pdf della Temperatura massima estiva sul Nord Italia (°C)

4. LA VALUTAZIONE DEGLI IMPATTI

Le modifiche del clima brevemente descritte nei paragrafi precedenti e che interesseranno anche la scala locale produrranno degli impatti sull'uomo e l'ambiente in cui vive in modo diretto ed indiretto, interagendo con l'intero sistema sociale ed economico. Le vulnerabilità associate ai molti sistemi suscettibili al cambiamento climatico riguardano la risorsa idrica, gli ecosistemi naturali, le aree costiere, l'industria e la capacità produttiva, l'agricoltura e la salute. Tali vulnerabilità, non solo dell'ambiente e del territorio, ma anche delle attività e dei sistemi socio-economici, sta aumentando in tutto il mondo ed è estremizzata dalla presenza di altri fattori di stress.

Possiamo riassumere in alcuni punti gli impatti più rilevanti che il climate change potrà determinare sull'area del Mediterraneo dove è ubicato il nostro paese e la nostra regione:

- La maggior frequenza di episodi di precipitazione intensa avrà un impatto molto elevato nell'area del Mediterraneo aumentando il rischio idrogeologico-idraulico in aree già molto esposte. In parallelo, l'occorrenza di più frequenti eventi di precipitazione intensa alternati a lunghi periodi di siccità potrà alterare il ciclo idrologico;
- La maggior frequenza di episodi siccitosi avrà ricadute negative sulla disponibilità di risorsa idrica (water scarcity) con conseguente aumentata "concorrenza" per l'approvigionamento idrico tra diversi settori della società;
- L'innalzamento del livello del mare e gli aumentati eventi di invasione marina delle aree costiere basse potranno accelerare l'erosione delle coste, aumentare la salinità negli estuari e nei delta a causa dell'ingresso del cuneo salino;
- L'aumento delle temperature medie ed estreme potrà determinare un'aumentata frequenza e durata delle onde di calore con gravi disagi alla salute delle popolazioni e notevoli ricadute anche in altre attività umane (es: turismo);.
- L'ulteriore impoverimento delle acque sotterranee e quindi il maggior inaridimento del territorio avrà conseguenze negative sull'agricoltura dove potranno verificarsi delle riduzioni delle rese e della qualità delle produzioni agrarie;
- Le aumentate temperature determineranno un aumento della richiesta energetica per condizionamento nei periodi estivi e causerà anche un maggior ristagno della circolazione estiva con impatti sulla qualità dell'aria (inquinamento da Ozono).

5. LE AZIONI DI ADATTAMENTO DA PREDISPORRE

Date tali premesse, diverrà sempre più strategico attuare politiche di mitigazione che conducano ad una riduzione delle emissioni di gas "serra" ed anche decise e razionali azioni di adattamento al cambiamento climatico, che siano orientate a limitare i "danni" potenziali delle conseguenze di tale cambiamento e sfruttarne le opportunità. Mentre le politiche di mitigazione possono essere attuate solo attraverso un'azione globale di coordinamento e attraverso trattati internazionali che poi potranno essere declinati anche alla scala locale, le azioni di adattamento possono essere di natura più locale poichè dipendono dalle diverse e locali condizioni di vulnerabilità territoriale e antropica che sono presenti nei sistemi naturali. E' su queste azioni che sicuramente l'azione locale dovrà più energicamente e rapidamente essere intrapresa, anche perchè i cambiamenti del clima sono inequivocabilmente già presenti e stanno già iniziando a creare problemi a diversi settori della società e a vari ecosistemi naturali.

Le azioni di adattamento servono ad ostacolare gli effetti del mutamento del clima puntando a ridurre il rischio e i danni derivanti dagli impatti negativi (presenti e futuri) del fenomeno in maniera efficace anche dal punto di vista economico. Molti impatti del cambiamento climatico possono essere affrontati efficacemente attraverso l'adattamento, in particolare quelli a breve termine, mentre all'aumentare dell'entità del cambiamento le opzioni efficaci diminuiscono ed i costi associati aumentano. Le conoscenze attuali già consentono la selezione di azioni di adattamento preventivo, che hanno costi limitati e non minacciano sistemi sociali e settori economici, e sono da preferire rispetto all'adozione di forme di adattamento di tipo reattivo, cioè applicate a seguito di frequenti crisi e disastri. Tuttavia tali opzioni sono attualmente applicate in modo limitato ed estemporaneo.

Tra le misure di adattamento, vi sono quelle di tipo infrastrutturale e tecnologico, caratterizzate da tempi di realizzazione spesso lunghi e da investimenti maggiori, la cui sostenibilità deve essere dimostrata sulla base dei costi stimati del non-agire, in un contesto di conoscenze che presenta margini di incertezza, tanto più elevati quanto più gli scenari di cambiamento sono a lungo termine. Poiché il dimensionamento dell'impatto è importante per definire le priorità ed indirizzare di conseguenza gli interventi, l'applicazione di queste misure, se non fortemente sostenute da politiche ambientali o sanitarie, potrebbe essere limitata.

Le misure di adattamento di tipo non-strutturale o "soft" sono invece basate su sistemi di ottimizzazione della gestione delle risorse, di prevenzione dei rischi e di adozione di buone pratiche in tutti i campi di attività dell'uomo, come, ad esempio, la gestione della risorsa idrica orientata ad un uso ottimale e conservativo, la variazione delle rotazioni delle colture e delle date di semina e l'uso di colture meno idroesigenti, i sistemi di preannuncio dei rischi che consentono l'adozione di misure preventive, la sensibilizzazione della popolazione finalizzata all'adozione di stili di vita consapevoli degli effetti del cambiamento climatico ed orientati a contrastarlo. I costi di queste forme di adattamento sono spesso trascurabili rispetto ai costi derivati dalla non-applicazione e sono già inclusi nei costi dell'evoluzione socio-economica, in quanto, rispondendo a necessità di tipo locale implicano benefici ambientali complessivi e creano importanti sinergie con le politiche di sostenibilità ambientale. Queste forme di adattamento, se da un lato sono più facilmente realizzabili, richiedono però la formazione di un contesto sociale e culturale permeabile e pro-attivo, insieme ad una capacità di governance coordinata a tutti i livelli.

I principali settori dove possono essere definite azioni di adattamento efficaci sono sicuramente l'agricoltura e lo sviluppo rurale, la produzione e il consumo di energia, la gestione della risorsa idrica. In agricoltura gli impatti dei cambiamenti del clima sulle rese e sulle produzioni potranno essere mitigati con politiche di adattamento imperniate su una più accorta gestione agricola e forestale sotto vari aspetti, ad esempio per l'utilizzo efficiente delle risorse idriche

in particolare nelle zone più aride, la gestione ottimale dei sistemi colturali, l'uso di colture e varietà meno idroesigenti, la protezione dei corsi d'acqua e delle falde contro un eccessivo afflusso di nutrienti, il miglioramento della gestione delle bonifiche.
Per quanto concerne la produzione e il consumo dell'energia il mutamento del clima offre nuove opportunità a fonti come l'eolico, e il solare termico e fotovoltaico. Estati più lunghe e secche potrebbero incidere negativamente su altri fonti energetiche, come l'idroelettrica, e faranno aumentare i consumi di elettricità connessi all'impiego degli impianti di condizionamento. Tutti questi aspetti mettono in evidenza la necessità di intraprendere azioni di diversificazione delle fonti energetiche, che promuovano le rinnovabili e facciano uso di reti di distribuzione in grado di far fronte alle fluttuazioni più consistenti in termini di domanda e di produzione di energia elettrica.
Per quanto riguarda la siccità e l'uso dell'acqua in tutti i settori (domestico, trasporti, energia, agricoltura e turismo), dato che si prevede una sempre più frequente occorrenza e intensità degli eventi estremi, dovrebbero essere studiate azioni di adattamento quali l'applicazione di politiche tariffarie efficienti, la strategia di elevare il risparmio idrico a priorità e il miglioramento dell'efficienza in tutti i settori.

RIFERIMENTI BIBLOGRAFICI

IPCC, 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (www.ipcc.ch)
R. Tomozeiu, C. Cacciamani, V. Pavan, A. Morgillo e A. Busuioc, 2007: Climate change scenarios for surface temperature in Emilia-Romagna (Italy) obtained using statistical downscaling models. In stampa su Theor. Appl. Climatol. (2007)
R. Tomozeiu, V. Pavan, C.Cacciamani, M. Amici, 2006: Observed temperature changes in Emilia-Romagna: mean values and extremes. Climate Research, 31, 217–225

CAMBIAMENTI CLIMATICI E MALATTIE DELL'UOMO: UNA PROSPETTIVA GLOBALE

ROBERTO BERTOLLINI, MD MPH

Dipartimento di Sanità Pubblica e Ambiente, OMS

Obiettivi della presentazione

L'obiettivo principale della presentazione sarà quello di fornire una panoramica generale sulla relazione tra cambiamenti climatici e salute umana.
In questo ambito verrà brevemente illustrato il piano di lavoro dell'OMS mirante a promovuore maggiore attenzione sui rischi per la salute connese ai cambiamenti climatici.

Riassunto della presentazione

Salute e Cambiamenti Climatici
Gli effetti dei cambiamenti climatici influenzeranno lo stato di salute di gran parte della popolazione del pianeta nei prossimi decenni e metteranno a rischio la vita di miliardi di persone. I rischi si articolano in due grandi categorie: quelli legati ad eventi estremi (alluvioni, ondate di calore) e quelli legati ai cambiamenti ecologici associati all'aumento di temperatura e alla maggiore variabilità climatica.

In sintesi si possono prevedere i:
• aumento del rischio di malnutrizione causato dall'impoverimento delle riserve idriche e dall'intensificarsi dei periodi di siccità e, di conseguenza, dalla correlata diminuzione della disponibilità dei generi alimentari;
• aumento delle morti, degli infortuni e dei disordini mentali post-traumatici dovuti a catastrofi naturali quali alluvioni, uragani, cicloni tropicali, ecc;
• cambiamenti nella distribuzione di alcune malattie infettive (aumento dei casi di malaria, dengue);
• aumento delle malattie diarroiche;
• aumento delle malattie cardio-polmonari dovute all'alta concentrazione di ozono in atmosfera;
• aumento dei decessi correlati alle alte temperature, a causa della maggiore frequenza delle ondate di calore.

Le persone a più alto rischio della congiunzione clima-salute sono quelli che vivono nelle zone geograficamente vulnerabili (zone costiere e piccole isole nei paesi in via di sviluppo (PVS), regioni montuose, megalopoli) ma anche i gruppi sociali che per caratteristiche personali (gli anziani) o economiche hanno meno accesso ai servizi medico-sanitari.

Sulla base di stime dell'OMS il cambiamento climatico causa fin da oggi circa 150.000 morti in piu' ogni anno, particolarmente nei paesi a basso reddito a causa di diversi fattori legati al clima come: cattivi raccolti e malnutrizione, diarrea, malaria e inondazioni.

Proteggere la salute dai cambiamenti climatici: il mandato dell'OMS
I Paesi Membri dell'OMS, tramite una risoluzione (61.19) ed un piano di lavoro approvati

dall'Assemblea Mondiale della Sanità nel 2008 e 2009, hanno sottolineato l'importanza di proteggere la salute dai cambiamenti climatici e hanno chiesto all'organizzione di focalizzarsi sui seguenti quattro obiettivi:

- aumentare la consapevolezza globale di questi temi
- dare rilievo alla questione sanitaria legata alla riduzione dei gas serra in tutti i settori (trasporti, abitazioni, energia, agricoltura) a livello nazionale, regionale e internazionale
- promuovere e supportare la raccolta e la diffusione di evidenza scientifica
- rafforzare i sistemi sanitari per superare le minacce per la salute create dai cambiamenti climatici.

Tre argomenti chiave

Basandosi su ricerche effettuate e prove scientifiche l'OMS ha identificato tre motivi per incoraggiare misure più forti per contrastare il riscaldamento del pianeta:

1) *i cambiamenti climatici hanno conseguenze negative sulla salute umana;*

2) *L'impatto dei cambiamenti climatici sulla salute si percepisce in maniera disuguale: una risposta efficace richiede un'azione globale* - il sistema sanitario deve avere accesso ai meccanismi finanziari e alle tecnologie in grado di proteggere i paesi a basso reddito piu' duramente colpiti da eventi climatici estremi e le popolazioni a piu' alto rischio;

3)La riduzione delle emissioni dei gas serra può portare beneficio alla salute umana oltre che ridurre i rischi ambientali (miglioramenti tangibili delle condizioni ambientali possono ridurre del 25% il peso globale delle malattie legate all'inquinamento atmosferico, al traffico, all'inattività fisica etc).

Questi sono i tre argomenti chiave che l'OMS sta promuovendo all'interno dei negoziati per un nuovo trattato globale per il controllo delle emissioni di gas serra che è in corso di discussione nell'ambito delle Nazioni.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

ATTIVITÀ ANTIRADICALICA TOTALE NEL SANGUE: DETERMINAZIONE DEI VALORI DI RIFERIMENTO NELLE SCROFETTE

TOTAL ANTIRADICAL ACTIVITY IN GLITS BLOOD: REFERENCE VALUES

PASTORELLI, G., CORINO, C., ROSSI, R., FAUSTINI, M.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano

Parole chiave: valori di riferimento, scrofette, KRL test; stress ossidativo
Key word: reference values, gilts, KRL test; oxidative stress

RIASSUNTO:
I radicali liberi sono delle specie chimiche altamente reattive e continuamente prodotte in condizioni normali. Una volta formati possono attaccare tutte le strutture all'interno dell'organismo. Un eccesso di radicali liberi può provocare disequilibri nel metabolismo cellulare e importanti danni ai tessuti. Nel test biologico KRL, tutto il potenziale antiossidante di un individuo può essere valutato sottoponendo il sangue intero o le emazie ad uno stress ossidativo. Tutti i sistemi enzimatici e chimici del campione vengono attivati per proteggere l'integrità delle cellule fino alla loro lisi. I risultati sono espressi come tempo di semi emolisi ($T_{1/2}$), cioè come tempo, espresso in minuti (min), necessario alla lisi del 50% delle cellule ematiche. Il KRL test è stato finora ampiamente utilizzato in vitro e in ambito umano; in campo veterinario sono pressoché assenti applicazioni nella specie suina; di qui la necessità di stabilire prima di tutto dei valori di riferimento per i diversi stadi fisiologici di questa specie. Sono stati effettuati dei prelievi ematici da 100 scrofette nel range di peso vivo compreso tra i 50 e i 150 kg e analizzati per l'attività antiradicalica totale. I dati sono stati sottoposti al test di normalità e quindi calcolati i valori di riferimento. I valori trovati del $T_{1/2}$ per sangue intero ed emazie sono rispettivamente compresi nel range di 66.8 – 94.80 e 42.6 – 56.4 minuti rispettivamente.

ABSTRACT
Free radicals are highly reactive chemical species continuously produced under normal biological conditions. Once formed these very reactive radical species can attack all structures within the body. So, an excess of free radicals may induce a pronounced impairment of the cellular metabolism and an important damage of tissues. In biological KRL Test the overall antioxidant potential of an individual is evaluated by submitting whole blood (or erythrocytes) to an oxidant stress. Both extracellular and intracellular antioxidant defense contributes, as inside the body, in maintaining the cell integrity until hemolysis.
Results are expressed as the half-hemolysis time ($T_{1/2}$), which is referred to the blood susceptibility to freeradical attack. The analysis is tested and successfully applied in vitro, on humans, but are lacking data on pig; firstly there is the necessity to establish reference values for KRL test in the different physiological period of this specie. In the present work, blood samples from 100 gilts in the range of 50-150 kg body weight were collected and analysed for total antiradical activity in order to determine reference intervals. Data were tested for normality and then submitted to reference limit evaluation. The reference values found in gilts, expressed as $T_{1/2}$ were 66.8 – 94.80 and 42.6 – 56.4 min for blood and red blood cell, respectively.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è fortemente cresciuta la sensibilità dell'opinione pubblica alle modalità dell'allevamento intensivo ed al benessere animale. Da un punto di vista metodologico il benessere può essere valutato attraverso differenti tipi di approccio; nella valutazione del benessere della specie suina l'approccio funzionale sembra essere quello che maggiormente si presta ad essere sviluppato.. Secondo un approccio funzionale le condizioni iniziali di squilibri fisiologici, di differente origine, in grado di condurre verso gravi condizioni di malessere e patologie di diverso tipo possono essere evidenziate attraverso la valutazione dello stress ossidativo in accordo con quanto riportato da Brambilla et al. (2002) secondo il quale la risposta allo stress ossidativo può essere considerata un parametro efficace di valutazione del benessere nel suino. Si è registrato negli ultimi 20 anni un interesse crescente nei confronti della biologia dei radicali liberi (Machlin e Bendich, 1987). I radicali liberi sono composti caratterizzati da una struttura elettronica sbilanciata che conferisce loro una grande reattività sui costituenti organici e sulle strutture cellulari. In condizioni normali la produzione di radicali liberi nell'organismo è bilanciata da una serie di fattori di protezione utilizzati per il loro controllo. I radicali liberi esercitano il loro effetto negativo a livello cellulare: con perossidazione degli acidi grassi polinsaturi delle membrane fosfolipidiche da cui la formazione di perossidi citotossici che determinano fenomeni infiammatori e morte cellulare. Inoltre, i radicali intermedi ossigenati rappresentano gli attivatori della carcinogenesi e delle malattie cardiovascolari.

La misura della capacità antiradicalica totale del sangue è utilizzata in ambito umano come indicatore dello stress e può essere determinate attraverso il test KRL (Kit radicali liberi) (Prost, 1989, 1992). Il test KRL misura il tempo necessario ad emolizzare il 50% dei globuli rossi esposti ad un attacco controllato di radicali liberi. Il principio del test è quello di sottoporre il sangue intero ad un'aggressione termocontrollata di radicali liberi in modo che tutti i sistemi antiossidanti presenti naturalmente nel sangue vengano mobilizzati per contrastare tale attacco antiossidante (Girodon et al., 1997; Lesgards et al, 2002; Pieri et al., 1996; Prost, 1989 e 1992; Stocker et al., 2003). Questa misura del potenziale di difesa antiradicalica globale tiene conto di tutta la complessità dei sistemi di difesa attivati dalle cellule.

Il test KRL ha diverse applicazioni in vivo, soprattutto in ambito umano o in vitro. Sull'uomo è stato utilizzato per valutare l'efficacia di trattamenti farmacologici e non, al fine di individuare processi acuti quali trauma o ischemia o malattie infiammatorie (Lesgards et al., 2002); inoltre ha permesso di discriminare tra condizioni di benessere e di stress di medio o elevato livello.

In vitro è stata valutata la determinazione della capacità antiossidante totale di alcuni composti quali le vitamine (Stocker et al., 2003), il beta idrossitoluene, carotenoidi, (Blache et al., 1991; Blache e Prost., 1992) ed antiossidanti naturali (Rossi et al., 2009a).

Poiché il suino data la particolare condizione d'allevamento intensivo è sottoposto a diversi fattori stressanti, la determinazione della capacità antiradicalica totale può rappresentare un valido strumento d'aiuto per monitorare lo stato clinico e il benessere. La prima necessità è tuttavia quella dell' individuazione dei valori normali della capacità antiradicalica totale in questa specie.

Il presente lavoro ha l'obiettivo di fornire un primo contributo alla definizione dei valori di riferimento della capacità antiradicalica totale del sangue intero e delle emazie nelle scrofette.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate 100 scrofette (Dalland), provenienti da due differenti siti del medesimo allevamento, con peso vivo compreso tra 50 e 150 kg, valutate clinicamente in buono stato di salute, per la determinazione della misura del potenziale globale di difesa antiradicali liberi. Dopo aver immobilizzato la testa dell'animale sono state prelevati, dalla vena cava anteriore, due provette di sangue contenenti EDTA destinate una alla determinazione della capacità antiradicalica totale sul sangue intero e l'altra sull'emazie. Tutti i campioni sono stati quindi refrigerati, inviati al laboratorio e processati entro due ore dal prelievo. I campioni di sangue diluiti con la soluzione fisiologica 1/50 e 1/25 rispettivamente per l'emazie e per il sangue intero, sono stati dispensati nella micropiastra KRL nei cui pozzetti precedentemente è stato aggiunto il generatore di radicali liberi rappresentato dal 2,2´-azobis (2-amidinpropane) diydrochloride (Spiral, Dijon, France). Quindi la piastra è stata inserita nel lettore di micro piastra programmato alla temperatura di 37°C.

Per ogni pozzetto sono eseguite 75 misure di assorbanza a 620 nm, ogni 150 secondi per seguire la cinetica di lisi delle cellule ematiche. La velocità massima di diminuzione dell'assorbanza (Vmax in mUA/min), il tempo di latenza (lag-time in min) e il tempo di semi-lisi ($T_{1/2}$ in min) caratterizzano la cinetica di emolisi del campione e sono calcolati automaticamente. La misura della diminuzione dell'assorbanza permettere di seguire la progressiva lisi cellulare. I risultati sono espressi come tempo necessario alla lisi del 50% delle cellule ematiche ($T_{1/2}$ in min).

Le prestazioni dello strumento fornite dalla ditta indicano un coefficiente di variazione dei valori del tempo di semi-emolisi inferiore al 4% (riproducibiltà) e un coefficiente di variazione dei valori del tempo di semi-emolisi su una piastra completa inferiore al 2,5% (ripetibilità). Poiché Il tempo di semi-emolisi varia in modo lineare con la concentrazione in Trolox è possibile esprimerlo in equivalenti Trolox e convertirlo in efficacia antiradicali liberi (EAR); 1 unità EAR per litro di sangue o di sospensione di emazie al 50% corrisponde alla potenza antiradicali liberi di una mmole di Trolox per litro di sangue di controllo.

Sulla piastra contenente i campioni, viene dosato anche un campione di sangue di controllo caratterizzato da di semi-emolisi noto.

I dati grezzi relativi al $T_{1/2}$ nel sangue e nei globuli rossi sono stati sottoposti al test di D'Agostino-Pearson per la normalità: in seguito si sono calcolati i valori di riferimento sulla distribuzione normale (test di D'Agostino-Pearson non significativo) o con metodo robusto non parametrico (test di D'Agostino-Pearson significativo), secondo le direttive NCCLS e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A2 and C28-A3. Le direttive prevedono il calcolo del 95% centrale della distribuzione e dell'intervallo di confidenza al 90% di ciascun limite. Per valutare la capacità antiradicalica nel sangue e negli eritrociti in relazione al peso, i soggetti sono stati suddivisi in due classi di peso (50-60 kg (n=65) e 150 kg (n=35)); per ciascuna classe si è provveduto al calcolo della differenza dei valori medi per ciascun gruppo (analisi della varianza ad una via seguita dal test di Student-Neuman-Keuls per confronti multipli) e alla determinazione dei valori di riferimento. In tal caso, essendo la numerosità campionaria ridotta il calcolo dei limiti è stato eseguito prendendo in considerazione il minimo e il massimo di ciascun gruppo, in quanto considerato la migliore stima dell'intervallo 95%.

RISULTATI

La media per $T_{1/2}$ sangue sul totale dei soggetti è risultata pari a 80.81±7.13 min, e per gli eritrociti 49.97±3.77 min. I valori di riferimento per il totale dei suini sono riportati in tabella 1, insieme ai limiti fiduciali degli stessi.

Parametro (n)	Norm	Limiti	CI90% l.i.	CI90% l.s.
T1/2 sangue, min (100)	Sì	66.8-94.8	65.0-68.9	92.7-96.8
T1/2 eritrociti, min(100)	Sì	42.6-56.4	41.5-43.7	56.3-58.4

Tabella 1- valori di riferimento per il $T_{1/2}$ in sangue ed eritrociti; CI90%l.i.: intervallo di confidenza al 90% per il limite inferiore; CI90%l.s.: intervallo di confidenza al 90% per il limite superiore. Norm: risultato del test di normalità secondo D'Agostino-Pearson.

Table 1. $T_{1/2}$ reference values in blood and red blod cell; CI90%: 90% confidence interval for lower limit (l.i.) and upper limit (l.s.). Norm.: normality of distribution (D'agostino-Pearson test)

I risultati relativi alla suddivisione dei suini in base al peso vivo sono riportati in tabella 2. L'analisi della varianza ha evidenziato differenze significative tra gruppi sia per il $T_{1/2}$ sangue ($p<0.01$) che per il $T1_{/2}$ emazie ($p<0.01$). in particolare, si nota che con l'aumentare del peso il $T_{1/2}$ tende a diminuire significativamente, lasciando supporre una correlazione negativa tra variabili.

	Media ± ds	Limiti	n
50-60 kg			
$T_{1/2}$ sangue (min)	82.52 ± 6.43	69.42-98.17	65
$T_{1/2}$ RBC (min)	51.13 ± 3.32	45.26-60.81	65
150 kg			
$T_{1/2}$ sangue (min)	77.63 ± 7.37	63.90-95.25	35
$T_{1/2}$ RBC (min)	47.82 ± 3.65	41.19-59.84	35

Tabella 2. $T_{1/2}$ in sangue ed eritrociti relative ai due gruppi di peso. Si riportano anche i valori di riferimento per i due gruppi, calcolati come minimo e massimo di ciascun gruppo. Differenza $p<0.001$ per $T_{1/2}$ sangue; differenza $p<0.001$ per $T_{1/2}$ per le emazie.

Table 2. $T_{1/2}$ in blood and erythrocytes in the two groups of subjects. The reference values are reported, calculated as minimum-maximum of the distribution. Means differ either for blood ($p<0.001$) or erythrocytes ($p<0.001$)

DISCUSSIONI

In letteratura sono scarsi i dati relativi al potere antiradicalico totale del sangue ed eritrociti nella specie suina: in questa prova si sono valutati i valori di riferimento di scrofette di peso 50-150 kg, con l'obiettivo di identificare tale parametro nelle categorie di suini in differenti periodi fisiologici.

L'analisi sul sangue intero permette di misurare sia le difese intracellulari che extracellulari, tenendo conto degli effetti di sinergia tra le due azioni. L'analisi sulle emazie permette di conoscere

specificamente lo stato delle difese intracellulari. Le due informazioni sono complementari. Poiché la durata di vita media delle emazie nella specie suina è di 60-85 giorni, il valore del $T_{1/2}$ relativo a questo parametro deve essere interpretato come un riflesso storico dell'equilibrio tra aggressioni e difese dell'organismo su un lungo periodo fisiologico. L'analisi KRL sul sangue intero dà al contrario una indicazione più immediata dello stato fisiologico dell'individuo.
I limiti rilevati sono sensibilmente più bassi di quelli riportati per la specie umana (84-101 min per il sangue; 66-75 min per gli eritrociti), e simili a quelli determinati in suinetti maschi castrati di peso compreso tra i 10 e 30 kg (59.34 - 93.6 min per il sangue e 43.94 e 66.9 min per le emazie) (Pastorelli et al., 2009). Le differenze significative riscontrate nelle due classi di peso esaminate sono verosimilmente riconducibili al peso differente, come già riscontrato nel suinetto in post svezzamento, in cui il trend negativo è probabilmente dovuto al particolare momento fisiologico e al rapido accrescimento (Rossi et al., 2009b). Nel caso specifico, le differenze riscontrate tra le due classi di peso potrebbe essere collegato al momento fisiologico, in quanto le scrofette del gruppo 150 kg si trovavano in attesa di fecondazione ed avevano inoltre subito uno spostamento di settore che potrebbe avere influito sul parametro indagato.

CONCLUSIONI

I parametri relativi all'attività antiradicalica totale potranno trovare un utilizzo nella valutazione del benessere nell' allevamento del suino in funzione del sistema di allevamento e/o di trattamenti alimentari.
Potrebbe essere utile indagare ulteriormente sulla differente attività antiradicalica totale valutando le fonti possibili di variazione e di influenza di tale parametro, come ad esempio l'età, il ceppo genetico, e il management.

RINGRAZIAMENTI

Attività svolta nell'ambito del progetto di ricerca ""***Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina***"" finanziato dalla Regione Lombardia - D.G. Agricoltura nell'ambito del Piano per la ricerca e lo sviluppo "***2008***".

BIBLIOGRAFIA

Blache, D., Prost M., Raffi J. (1991). In vitro biological test of resistance to oxidation: Application to identification of irradiated food. In Potential New Methods of Detection of Irradiated Food. Commission of the European Communities, Luxembourg, pp. 105-116.
Blache, D., Prost. M. (1992). Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution): A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL). C. Ponnamperuma and C. W. Gehrke, editors. NASA, Washington D.C., pp. 82-98. Brambilla G.,. Civitareale, C., Ballerini, A., Fiori, M., Amadori, M., Archetti, L. I., Regini, M., Betti, M. (2002). Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine. Redox Rep., 7 (3): 159-163.
Girodon, F., Blache, D.,. Monget, A. L, Lombart, M. Brunet-Lecompte, P., Arnaud, J.,. Richard, M. J., Galan P. (1997). Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. J. Am. Coll. Nutr. 16: 357–365.
Lesgards, J. F., Durand, P., Lassarre, M., Stocker, P., Lesgards, G., Lanteaume, A., Prost, M., Lehucher-Michel, M.-P. (2002). Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. Environ. Health Perspect., 110: 479-487.
Machlin, L., Bendich, A. J. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The FASEB J., 1: 441-445.

Pastorelli, G., Rossi R., Cannata, S., Corino, C. (2009). Total antiradical activity in male castrated piglets blood: reference values. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,Ital. J. Anim. Sci. 8 (suppl. 2):640-642.
Pieri, C., Moroni, F., Marra. M. (1996). Food restriction increases the protection of erythorcytes against the hemolysis induced by peroxyl radicals. Mech. Ageing Dev. 87:15-23.
Prost M. (1989). Utilisation de générateur de radicaux libres dans le domaine des dosages biologiques. French patent no. 2, 642,526.
Prost, M. (1992). Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of living organism or potentially aggressive agents. US patent, 5, 135, 850.
Rossi, R., Corino, C., Pastorelli, G., Durand, P., Prost M. (2009a). Assessment of antioxidant activity of natural extracts. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,Ital. J. Anim. Sci 8 (suppl. 2): 655-657.
Rossi, R., Pastorelli, G., Cannata, S., Corino, C. (2009). Effect of weaning on total antiradical activity in piglets. XVIII Congresso ASPA, Palermo, 9-12 giugno 2009.,Ital. J. Anim. Sci. 8 (suppl. 2):673
Stocker, P., Lesgards, J. F., Vidal, N., Chalier, F., Prost M. (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. Biochem Biophys. Acta 1621:1–8.

UTILIZZO DELLA CARTA QUALE MATERIALE PER LA NIDIFICAZIONE NELLA SCROFA: VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI ZOOTECNICI, COMPORTAMENTALI E DEL CORTISOLO SALIVARE

USE OF PAPER STRIPS AS NESTING MATERIAL IN SOWS: EVALUATION OF SOME ZOO-TECHNICAL PARAMETERS, BEHAVIOURS AND SALIVAR CORTISOL

ZAPPULLA D.[1], ROTA NODARI S.[2], NASSUATO C.[2], VINCO L. J.[2], CANDOTTI P. [2]

[1]Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Università degli Studi di Parma;
[2]Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia.

Parole chiave: scrofa, stress, materiale per la nidificazione, carta, cortisolo, benessere.
Key Words: sow, stress, nesting material, paper, cortisol, welfare.

RIASSUNTO
La prova sperimentale è stata condotta in un allevamento a ciclo chiuso di 150 scrofe con una organizzazione a bande di 5 settimane. Nello studio sono state prese in considerazione 3 bande consecutive, ciascuna delle quali è stata suddivisa in un gruppo prova e uno controllo. Nel gruppo prova ad ogni scrofa è stato somministrato come materiale di nidificazione un quantitativo di 2kg di carta al giorno 112 di gestazione, nessun materiale invece al gruppo controllo. La prova durava dal giorno 90 di gestazione al giorno dello svezzamento. Sono stati valutati il cortisolo salivare in 6 momenti distinti nel periodo preso in esame; sono stati valutati inoltre i vizi comportamentali delle scrofe e i parametri produttivi delle nidiate. I risultati hanno evidenziato un minore incremento del cortisolo ematico rispetto al valore basale della gestazione nei soggetti trattati rispetto ai controlli così come un numero inferiore di stereotipie, in particolare il comportamento di masticazione a vuoto. I parametri produttivi, in particolare il numero di suinetti schiacciati o cannibalizzati e il numero di suinetti svezzati/scrofa è risultato migliore nel gruppo trattato rispetto al non trattato. Questo studio conferma l'importanza del materiale di nidificazione per la scrofa e l'utilità della carta come materiale di arricchimento ambientale.

ABSTRACT
The survey was carried out in a farrow to finish farm of 150 sows with a 5-week batch management. Three consecutive batch were included in the study. In each batch sows were divided in a treatment group and in a control group. In the treatment group sows were given 2 kg of paper strips at 112 day of gestation; in control group sows were left in a barren environment. The study was conducted between day 90 of gestation and the day of weaning. Salivar cortisol was evaluated at 6 time points; abnormal behaviour and performance data of the litters were recorded. In the treated group compared to the control group results showed a lower increase from the basal level of cortisol and less abnormal behaviours, particularly of sham mastication. Productive data, particularly the number of crushed or cannibalized piglets and the number of weaned piglets/sows were better in the treated group compared to the control group. This survey confirms the importance of nesting material for sows and the benefits of strip paper as environmental enrichment.

INTRODUZIONE

In natura uno dei comportamenti caratteristici assunti dai mammiferi prima dell'inizio del parto è la costruzione del nido; questo comportamento negli animali è innato, ereditario e predefinito (Eibl-Eibesfeldt I., 1963). Generalmente la scrofa inizia a costruire il nido 24 ore prima del parto, mostrando una più spiccata attività dalle 12 alle 6 ore prima (Jensen P., 1989; Cronin G.M. et al., 1994). Il nido in genere viene terminato 2-4 ore prima e da questo momento in poi la scrofa rimane coricata al suo interno, questo è un *pattern* visto sia nelle scrofe selvatiche che in quelle domestiche (Jensen P., Vestergaard K., Algers B., 1993).

La costruzione del nido, può essere classificata in due fasi consecutive: nella prima fase, la scrofa annusa e scava il terreno formando una buca poco profonda; nella seconda fase l'animale raccoglie e sistema il materiale che serve per la costruzione del nido (Jensen P., 1993) La costruzione del nido è influenzata da stimoli interni ed esterni (Jensen P., 1993). La prima fase è regolata da stimoli interni, in particolare è scatenata dall'aumento dei livelli di prolattina (Widowski T.M. et al., 1990; Castrén H. et al., 1993). La seconda fase dipende da stimoli esterni, ovvero, dalla disponibilità dei materiali idonei per la costruzione del nido (Arey D.S., Petchey A.M., Fowler V.R., 1991).La fine della costruzione del nido è correlata ad un aumento dei livelli di ossitocina all'incirca 4 ore prima del parto (Castrèn H. et al., 1993).

Negli allevamenti commerciali di maiali, i comportamenti materni di solito sono molto limitati (Von Borell E., Dobson H., Prunier A., 2007) perchè sono stati introdotti su larga scala sistemi come la gabbia parto per controllare i movimenti dell'animale.

Nonostante ciò, molti comportamenti sono ancora presenti in quanto gli animali continuano a mostrare atteggiamenti indicativi della costruzione del nido nel periodo preparto, come l'incremento di attività (Meunier-Salaün M.C. et al., 1991) e, in mancanza di materiale per la nidificazione, l'attenzione rivolta verso il pavimento e le strutture delle gabbie (Lawrence A.B. et al., 1994). In un ambiente arido di stimoli come la gabbia parto, gli animali possono quindi sviluppare atteggiamenti stereotipati come la masticazione a vuoto, il mordere le barre (*The welfare of intensively kept pigs, Report of the Scientific Veterinary Committee*, 1997) o passare frequentemente dalla posizione eretta a quella coricata e viceversa (Hecket W.L. et al., 1988; Jensen P., 1988).

In uno studio effettuato confrontando scrofette in gabbia parto senza materiale per la nidificazione e scrofette allevate nei recinti con paglia a disposizione si è evidenziato nelle prime un livello più elevato di ACTH e cortisolo plasmatico (Lawrence A.B. et al., 1994; Jarvis S. et al., 1997, 1998, 2001, 2002), considerato un indicatore di stress, nel periodo che precede il parto (Lawrence A.B. et al., 1994).

Lo stress preparto, dovuto alla costrizione in gabbia in questo particolare periodo, può essere la causa di un parto più lungo, aumentando quindi il rischio di anossia, morte fetale dei suinetti (Bäckström L., 1973) e di problemi durante la lattazione (Poe Jr E.R., 1960). Un ambiente stressante inibisce, infatti, la produzione di ossitocina della scrofa e questo può compromettere la salute della madre e della prole poiché quest'ormone influenza il comportamento materno (Jarvis S. et al., 1997).

Con l'attuazione del decreto legislativo 20 febbraio 2004, n. 53, che apporta sostanziali modifiche al decreto legislativo 30 dicembre 1992, n.534, questa condizione di stress potrebbe anche aumentare. L'obbligo, infatti, di mantenere le scrofe in gruppo per la maggior parte della gestazione e la loro brusca ricollocazione nella gabbia singola della sala parto a partire da almeno sette giorni dalla data prevista per il parto, potrebbe costituire un cambio troppo radicale per l'animale (Boyle L.A. et al., 2000). Allo stress derivante dall'avvicinarsi del parto e dall'impossibilità di costruire il nido si andrebbe così a sommare lo stress derivante dal passaggio dalla stabulazione libera a quella strettamente confinata.

Rendendo, invece, disponibile materiale per la nidificazione, le scrofe evidenziano dapprima una fase molto attiva di preparazione del nido, e, dopo l'inizio del parto, atteggiamenti passivi e molto tranquilli (Cronin G.M. et al., 1993). Questo riduce non solo la durata del parto (Cronin G.M. et al., 1994), con conseguente maggior numero di suinetti nati vivi (Cronin G.M. et al., 1993), ma anche il numero di animali schiacciati durante il parto (Thodberg K. et al., 1999).
L'obiettivo di questo lavoro consiste nello sperimentare un materiale alternativo alla paglia, la carta, per la costruzione del nido in un allevamento convenzionale per studiarne gli effetti sui parametri produttivi, i parametri correlati al benessere delle scrofe e dei loro suinetti.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Per la prova è stato selezionato, nella provincia di Brescia, un allevamento a ciclo chiuso di 150 scrofe ibride (L x LW) comprese tra il primo e il settimo parto, gestito in bande di cinque settimane.
In gestazione le scrofe dell'allevamento erano stabulate in un'unica grande sala, disposte groppa-groppa.
In sala parto le gabbie erano suddivise in tre stanze; tutte le gabbie parto erano di tipo convenzionale.
La pavimentazione dell'intera gabbia parto era costituita da grigliato in materiale ferroso. La ventilazione delle stanze era di tipo artificiale (controsoffitto) con estrazione forzata di aria e sistema di *cooling* estivo.
La luce era di tipo naturale e poiché la prova è stata eseguita nel periodo primaverile-estivo la luce era presente tra le ore 7:00 e le ore 19:00 circa.

Animali

Per la sperimentazione sono stati scelti animali che si trovano nel periodo compreso tra il giorno 80 e 90 di gestazione. La prova è durata dal giorno di inclusione fino al giorno dello svezzamento della nidiata con l'analisi complessiva di tre bande.
Per la prova sono state selezionate 91 scrofe; in ciascuna banda le scrofe sono state suddivise a *random* in due gruppi: il gruppo "non trattato" (n = 55) è stato impiegato come controllo, mentre il gruppo "trattato" (n = 36) è stato sottoposto alla prova.
Al giorno 107-108 di gravidanza le scrofe oggetto della prova venivano spostate dal settore gestazione a quello di lattazione. Al giorno 112 di gestazione al gruppo in sperimentazione, sul pavimento e davanti la testa, sono stati forniti 2 kg di carta in strisce per capo. Il giorno di entrata e quello di uscita dalla sala parto su ogni scrofa veniva registrato il *Body Condition Score* (BCS).
Per ogni scrofa e le relative nidiate venivano registrati i seguenti dati: giorno del parto, patologie della scrofa e i relativi trattamenti terapeutici, numero dei suinetti nati vivi totali, dei suinetti nati vivi normali (con peso superiore al chilo), dei suinetti nati vivi sottopeso (con peso inferiore al chilo), dei suinetti nati morti (mummificati, macerati e nati morti), baliaggi, suinetti schiacciati, suinetti morti per cannibalismo, suinetti morti per altri motivi (es. malattie), i suinetti svezzati totali, i suinetti svezzati considerati "scarti sanitari" (malattia, traumi, ecc.), suinetti svezzati sottopeso (con peso inferiore ai 5.5 Kg). Lo svezzamento si effettuava a 26 ± 2 giorni di vita.

Test e osservazioni comportamentali

Tutte le osservazioni sono state effettuate dal medesimo operatore. Per abituare gli animali alla sua presenza, questi si è occupato della loro alimentazione e pulizia a partire dal giorno di entrata in sala parto.

Test di evitamento
Al giorno 100 di gravidanza si è proceduto ad effettuare un test di evitamento secondo quanto indicato da (Hemsworth P.H., 1981). In particolare tra le ore 8:00 e le ore 9:00 (il pasto era stato somministrato alle ore 7:00) ad ogni scrofa è stato somministrato singolarmente nella mangiatoia un piccolo quantitativo di alimento destinato alla categoria suinetti. Nel momento in cui la scrofa iniziava ad assumere l'alimento, lo sperimentatore, in posizione frontale rispetto alla mangiatoia, abbassava lentamente la sua mano fino a toccare il grugno dell'animale. Le scrofe che continuavano ad alimentarsi rimanendo in prossimità dell'alimento ricevevano un punteggio pari a zero. Nel caso in cui le scrofe si fossero allontanate, lo sperimentatore avrebbe mantenuto la sua posizione e alla scrofa veniva dato un punteggio pari al numero di secondi impiegati per ritornare in prossimità dell'alimento. Il test terminava dopo 10 secondi, pertanto, una scrofa che si allontanava riceveva un punteggio da 1 ad un massimo di 10 (Rota Nodari et al. 2006).
Nel caso in cui la scrofa non si fosse allontanata riceveva un punteggio pari a 0.

Osservazioni comportamentali
Durante la prova, in alcuni giorni prestabiliti, un operatore valutava i comportamenti degli animali che successivamente venivano registrati in un'apposita scheda. L'osservatore entrava in sala alle ore 11:00 e dopo 5 minuti iniziava la sessione di osservazione continua della durata di 20 minuti. Le osservazioni del giorno 100 di gestazione venivano riportate nella scheda A; quelle del giorno 107 di gestazione nella scheda B; quelle raccolte rispettivamente dal giorno 112 al giorno 115 di gestazione nella scheda C; le osservazioni del primo giorno di lattazione venivano inserite nella scheda D. Sono stati registrati i comportamenti elencati in tabella 1.

Campioni di saliva
I campioni di saliva per l'analisi del cortisolo sono stati prelevati al giorno 101, 107, 112, 113 di gestazione, al giorno 1 e 28 di lattazione.
I campioni sono stati raccolti tra le ore 9:00 e le ore 10:00 del mattino facendo masticare agli animali per 1-2 minuti un tampone di cellulosa (Salivette®) che successivamente veniva riposto nella relativa provetta di plastica. Dopo il prelievo i tamponi venivano conservati in frigorifero alla temperatura di 4°C e in giornata portati al laboratorio d'analisi; qui veniva estratta la saliva tramite centrifugazione (3000rpm, 15min., 4°C). La saliva veniva quindi raccolta in provette Eppendorf® e conservata in freezer a -80°C fino alla determinazione del cortisolo. La presenza dell'ormone è stata quantificata mediante la metodica IMMULITE ONE, secondo le procedure adottate dal laboratorio.

Analisi statistica
L'effetto del trattamento e del tempo sui parametri di interesse quali il cortisolo e i parametri produttivi (nati vivi, nati morti, schiacciati, cannibalizzati) e comportamentali (presenza di anomalie pre-parto e post-partum è stato esaminato mediante un'analisi della varianza per misure ripetute applicando un modello generalizzato a effetti misti. Il trattamento ed il tempo sono stati inclusi come effetti fissi. Le bande di appartenenza ed i suini sono stati trattati come effetti random per tenere in considerazione la correlazione tra misure effettuate sullo stesso soggetto o su soggetti appartenenti alla stessa banda. La risposta al test di evitamento è stata inserita come covariata. E' stato testato il termine di interazione tra trattamento e tempo per indagare se l'effetto del trattamento variasse al variare del tempo di prelievo. Sono stati considerati indicativi di significatività statistica valori di p-value inferiori a 0.05.
La presenza di differenze tra i due gruppi nel test di evitamento è stata verificata tramite Kruskal Wallis rank sum test. L'analisi statistica è stata effettuata con il software open-source R (versione 2.8.1).

Tabella 1. Parametri comportamentali
Table 1. Behavioural parameters

TIPO DI COMPORTAMENTO	DEFINIZIONE	SCHEDA DI RIFERIMENTO
Morsicatura della mangiatoia	Movimenti di masticamento sul bordo della mangiatoia, impegnando lingua e denti sulla superficie	A, B, C, D
Morsicatura delle barre	Mordere, rosicchiare o far scivolare la bocca sulle barre metalliche di una gabbia	A, B, C, D
Masticazione a vuoto	Azione della masticazione svolta senza la presenza di cibo o altro materiale nel cavo orale. Tale azione può essere associata a ipersalivazione	A, B, C, D
Gioco con abbeveratoio	Pressione ripetuta sull'erogatore di un abbeveratoio ad imbocco, senza ingerire acqua	A, B, C, D
Grattamento contro le barre	Una parte del corpo si muove avanti e indietro contro le sbarre metalliche	A, B, C, D
Posizione *self coping*	Posizione di riposo sulla parte caudale del corpo, simile a cane seduto, spesso associata a sguardo sonnolento	A, B, C, D
Aggressività verso le compagne	Atteggiamento ostile di un animale che sfocia in attacchi con morsi verso altri membri del gruppo	A
Aggressività verso l'operatore	Morsicatura da parte di un animale a una persona che tenta di avvicinarsi	A, B, C, D
Paura dell' operatore	Retrazione o tentativo di fuga (anche in gabbia) all' avvicinarsi dell' operatore	A, B, C, D
Aggressività verso la prole o cannibalismo	Creare ferite o uccisione della prole in modo volontario e non accidentale	D

Analisi statistica

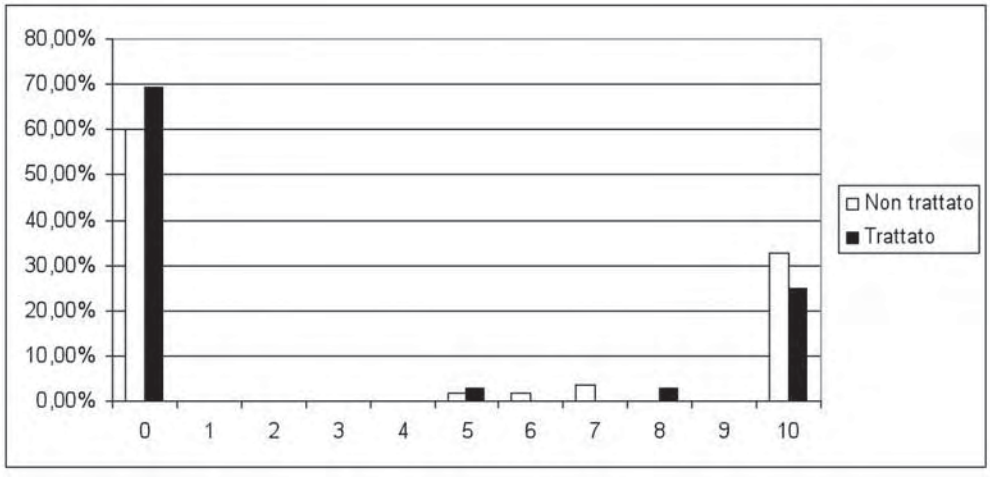
L'effetto del trattamento e del tempo sui parametri di interesse quali il cortisolo e i parametri produttivi (nati vivi, nati morti, schiacciati, cannibalizzati) e comportamentali (presenza di anomalie pre-parto e post-partum è stato esaminato mediante un'analisi della varianza per misure ripetute applicando un modello generalizzato a effetti misti. Il trattamento ed il tempo sono stati inclusi come effetti fissi. Le bande di appartenenza ed i suini sono stati trattati come effetti random per tenere in considerazione la correlazione tra misure effettuate sullo stesso soggetto o su soggetti appartenenti alla stessa banda. La risposta al test di evitamento è stata inserita come covariata. E' stato testato il termine di interazione tra trattamento e tempo per indagare se l'effetto del trattamento variasse al variare del tempo di prelievo. Sono stati considerati indicativi di significatività statistica valori di p-value inferiori a 0.05.

La presenza di differenze tra i due gruppi nel test di evitamento è stata verificata tramite Kruskal Wallis rank sum test. L'analisi statistica è stata effettuata con il software open-source R (versione 2.8.1).

RISULTATI

In figura 1 viene riportato graficamente l'esito del test di evitamento suddiviso nei 2 gruppi sperimentali.

Figura 1. Esiti del test di evitamento
Fig 1. Results of the avoidance test



In tabella 2 e 3 vengono riportati i dati produttivi relativi alle nidiate dei due gruppi.

Tabella 2. Risultati relativi alle nidiate
Table 2. Performance data of the litters

Gruppo	NVT	NVT media (DS)	NV	NV media (DS)	SP	SP media (DS)	NM	NM media (DS)	SC	SC media (DS)	% SC/ NVT	CAN	CAN Media (DS)	% CAN/ NVT	MA	MA media (DS)	% MA/ NVT	BAL
non trattato	728	13,24 (3,21)	545	9,91 (2,0)	183	3,33 (2,0)	110	2 (2,45)	103	1,87 (2,32)	14	21	0,38 (1,56)	2,8	11	0,2 (0,52)	1,5	15
trattato	441	12,25 (3,38)	341	9,47 (2,36)	100	2,78 (1,51)	59	1,64 (2)	41	1,14 (1,17)	9,3	2	0,06 (0,33)	0,4	3	0,08 (0,28)	0,7	-9

Legenda: NVT = nati vivi totali; NV = nati vivi normali; SP = sottopeso; NM = nati morti; SC = schiacciati; CAN = suinetti uccisi dalla madre; MA = morte per altri motivi; DS = deviazione standard.
Legend: NVT = total number of piglets born alive; NV = number of normal piglets born alive; SP = piglets underweight; NM = total number of piglets born dead; SC = piglets crusched; CAN = piglets savaged by their sow; MA = piglets dead for other reasons; DS = standard deviation.

In tabella 3 vengono riportati i dati che riguardano le nidiate del gruppo trattato e non trattato.

Tabella 3. Risultati relativi alle nidiate (svezzamento)
Table3. Performance data of the litters (weaning)

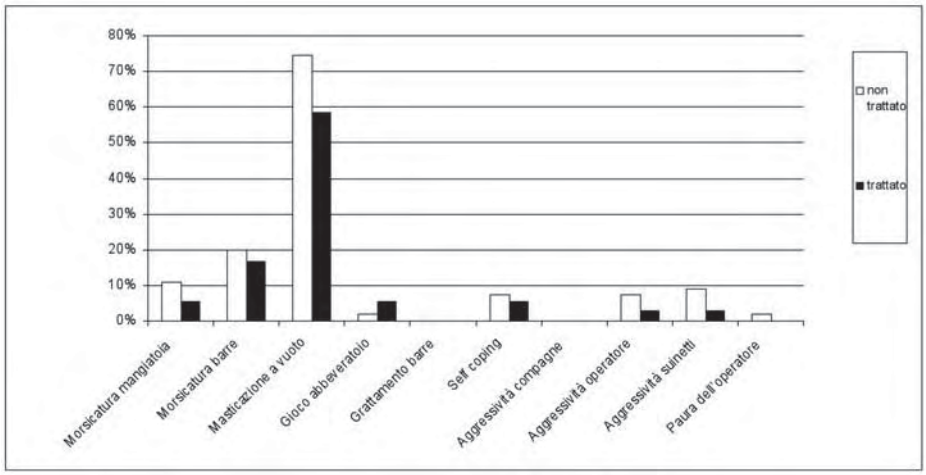
Gruppo	STOT	STOT Media (DS)	% STOT/ NVT	SN	SN media (DS)	% SN/ STOT	SSC	SSC media (DS)	% SSC/STOT	SSP	Media SSP (DS)	% SSP/STOT
non trattato	589*	10,71 (1,0)	81	500	9,09 (1,27)	82,8	10	0,18 (0,51)	1,6	94	1,71 (0,81)	15,6
trattato	392**	10,89 (1,30)	89	337	9,36 (2,07)	86,0	15	0,42 (1,70)	3,8	40	1,11 (0,82)	10,2

*Il gruppo non trattato ha ricevuto 15 suinetti in balia; le medie in questa tabella non sono state ricalcolate per tale dato
** Il gruppo trattato ha ceduto 9 suinetti in balia; le medie in questa tabella non sono state ricalcolate per tale dato

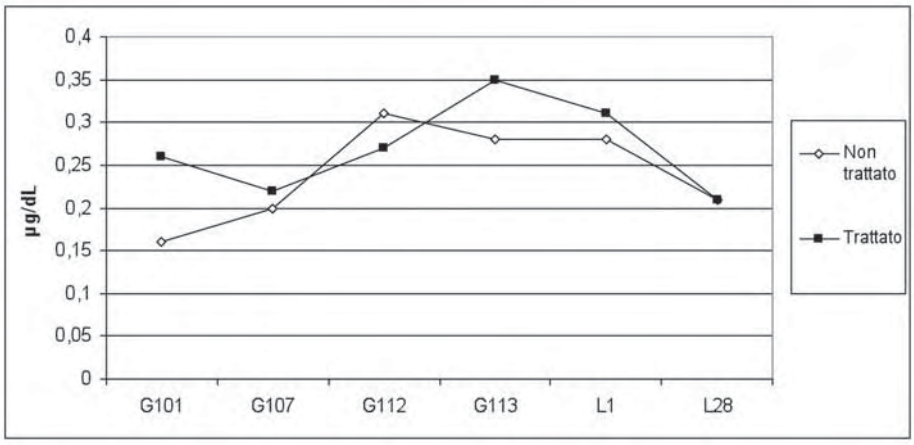
Legenda: STOT = svezzati totale; SN = svezzati normali; SSC = svezzati scarto; SSP = svezzati sotto peso; BAL = baliaggi; DS = deviazione standard.
Legend: STOT = total weaned piglets; SN = normal weaned piglets; SSC =piglets weaned as runts ; SSP = piglets weaned underweight; BAL = piglets nursed by other sows; DS = standard deviation

In figura 2 viene riportata graficamente la percentuale di scrofe di entrambe i gruppi che hanno manifestato i comportamenti stereotipati rispetto alle scrofe osservate.

Figura 2. Percentuale di scrofe che hanno manifestato i comportamenti nel periodo di osservazione
Fig 2. Percentage of sows that showed the behaviour during the observation period



L'analisi statistica ha evidenziato un odds di anomalie comportamentali pre parto di 2.86 (CI 95%: 1.07-7.65) volte nei non trattati rispetto ai soggetti trattati.

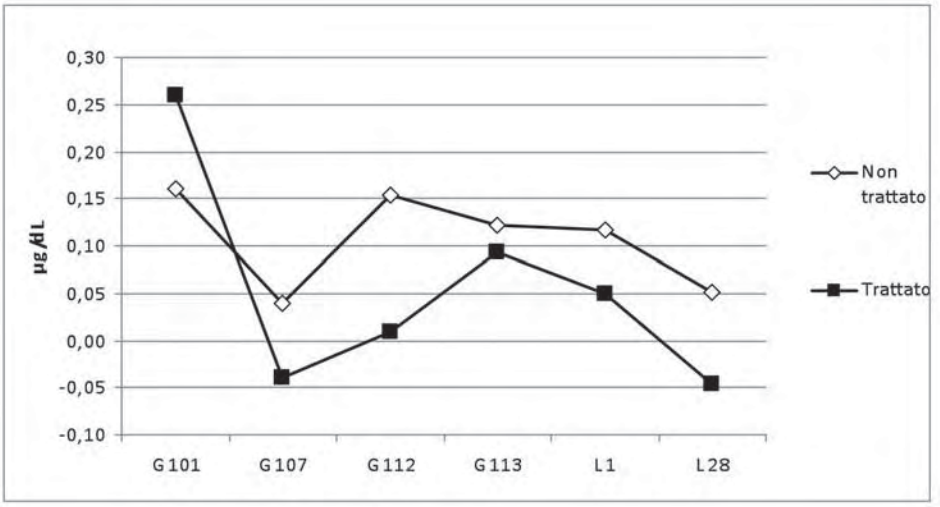


In figura 3 vengono espresse graficamente le medie dei valori di cortisolo salivare delle scrofe misurate in μg/dL.

Figura 3. Media dei valori del cortisolo salivare nei 2 gruppi di trattamento
Fig 3. Average salivar cortisol in the two groups of treatments
Legenda: G101 = 101gg di gestazione; G107 = 107gg di gestazione; G 112 = 112gg di gestazione; G113 = 113gg di gestazione; L1 = 1gg lattazione; L28 = 28gg di lattazione. *Legend: G101 = day 101 of gestation; G107 = day 107 of gestation; G112 = day 112 of gestation; G113 = day 113 of gestation; L1 = day 1 of lactation; L28 = day 28 of lactation.*

Nella figura 4 vengono riportate graficamente le differenze tra le medie dei valori di cortisolo nei vari prelievi (G107, G112, G113, L1 e L28) rispetto al valore di cortisolo a G101 che viene preso come valore base degli animali.

Figura 4. Variazione di cortisolo nei diversi prelievi rispetto a G101
Fig 4. Change in cortisol values in comparison to the level at D101



Legenda: G101 = 101gg di gestazione; G107 = 107gg di gestazione; G 112 = 112gg di gestazione; G113 = 113gg di gestazione; L1 = 1gg lattazione; L28 = 28gg di lattazione.
Legend: G101 = day 101 of gestation; G107 = day 107 of gestation; G112 = day 112 of gestation; G113 = day 113 of gestation; L1 = day 1 of lactation; L28 = day 28 of lactation.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno evidenziato un buon rapporto uomo-animale all'interno dell'azienda sperimentale, dal momento che la maggior parte delle scrofe ha risposto al test di evitamento senza allontanarsi dall'operatore.

I risultati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi relativamente al livello di cortisolo. Tuttavia, è evidente come il livello di cortisolo "basale" misurato al giorno 101 di gestazione fosse molto maggiore nelle scrofe successivamente sottoposte al trattamento con carta. Il cortisolo misurato nella saliva rappresenta, infatti, solo il 5-10% del cortisolo ematico circolante (Ruis et al., 2005) e, pertanto, piccole variazioni in questa matrice riflettono ampie variazioni a livello ematico

Con l'introduzione della carta al 112° giorno di gestazione nel gruppo trattato, il fisiologico aumento di cortisolo dovuto all'approssimarsi del parto è come differenza molto minore nel gruppo trattato rispetto al gruppo non trattato. Nonostante il primo giorno di lattazione la carta fosse stata rimossa, nel gruppo trattato si osserva comunque un calo del cortisolo rispetto ai valori delle determinazioni precedenti. Studi precedenti (Jarvis et al., 2001) hanno evidenziato come una stabulazione in sala parto più confortevole per le scrofe (in box anziché in gabbia parto) avesse un effetto positivo sul livello di cortisolo.

L'effetto positivo del trattamento si evidenzia in modo statisticamente significativo sulla presenza di stereotipie. Numerosi soggetti, hanno manifestato comportamenti anormali, in

particolare, il comportamento anormale più frequentemente osservato è stata la masticazione a vuoto che ha avuto una prevalenza complessivamente maggiore negli animali non trattati. La carta, pertanto, potrebbe essere una risorsa importante per l'animale, non solo nella fase pre-parto, ma sempre in un ambiente così confinato. Anche se non statisticamente significativi, i dati relativi alla nidiate indicano un effetto positivo dell'arricchimento ambientale. Il numero degli animali nati morti è, infatti, inferiore negli animali trattati, così come il numero di animali schiacciati e cannibalizzati dalla madre. Il numero di animali uccisi dalla madre è solo dello 0,4% sul totale dei nati negli animali trattati rispetto al 2,8% degli animali non trattati. E' decisamente positivo il dato relativo al numero di animali svezzati/scrofa che è maggiore negli animali trattati rispetto al controllo.

CONCLUSIONI

Nonostante l'utilizzo di materiali di nidificazione sia ritenuto potenzialmente rischioso per eventuali danni al sistema di drenaggio dei liquami, questo studio ha evidenziato come una scelta accurata del materiale in termini di tipologia, quantità e gestione non porti alcun danno manageriale bensì a benefici produttivi.
La somministrazione della carta ha, infatti, dimostrato di avere effetti positivi sulle scrofe stabulate in gabbia singola sia come materiale di nidificazione che come materiale manipolabile. L'effetto positivo si è manifestato sia da un punto di vista comportamentale che produttivo.

La ricerca è stata in parte finanziata con i fondi del Progetto di Ricerca Corrente 14/2008 (Influenza di alcuni parametri di tipo ambientale sul benessere di alcune specie (bovini, suini, tacchini, galline ovaiole, capre) nelle diverse realtà di allevamento italiane).

Si ringrazia il dott. Zavattini Silvio per la collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

AREY D. S., PETCHEY A. M. & FOWLER V. R. (1991) The preparturient behaviour of sows in enriched pens and the effect of pre-formed nests. Applied Animal Behaviour Science 31, 61-68

BACKSTROM L. (1973) Environment and animal health in piglet production. A field study of incidences and correlations. Acta Veterinaria Scandinavica 41, 1-223

BOYLE L., LEONARD F., LYNCH P. & BROPHY P. (2000) Influence of housing system during gestation on the behaviour and welfare of gilts in farrowing crates. ANIMAL SCIENCE-GLASGOW- 71, 561-570

BURNE T. H. J., MURFITT P. J. E. & JOHNSTON A. N. B. (2001) PGF2α-induced nest building and choice behaviour in female domestic pigs. Applied Animal Behaviour Science 73, 267-279

CASTRÉN H., ALGERS B., DE PASSILLÉ A. -., RUSHEN J. & UVNÄS-MOBERG K. (1993) Preparturient variation in progesterone, prolactin, oxytocin and somatostatin in relation to nest building in sows. Applied Animal Behaviour Science 38, 91-102

COMMISSION DIRECTIVE 2001/93/CE of 9 November 2001 amending Directive 91/630/EEC laying down minimum standards for the protection of pigs

CRONIN G. M., SCHIRMER B. N., MCCALLUM T. H., SMITH J. A. & BUTLER K. L. (1993) The effects of providing sawdust to pre-parturient sows in farrowing crates on sow behaviour, the duration of parturition and the occurrence of intra-partum stillborn piglets. Applied Animal Behaviour Science 36, 301-315

CRONIN G. M., SIMPSON G. J. & HEMSWORTH P. H. (1996) The effects of the gestation and farrowing environments on sow and piglet behaviour and piglet survival and growth in early lactation. Applied Animal Behaviour Science 46, 175-192

CRONIN G. M., SMITH J. A., HODGE F. M. & HEMSWORTH P. H. (1994) The behaviour of primiparous sows around farrowing in response to restraint and straw bedding. Applied Animal Behaviour Science 39, 269-280

Decreto legislativo 30 dicembre 1992, n.534 attuazione della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. (Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale 11 gennaio 1993, n. 7, S.O.)

Decreto legislativo 20 febbraio 2004, n.53. attuazione della direttiva n. 2001/93/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. (Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale N. 49 del 28 Febbraio 2004)

EIBL-EIBESFELDT I. (1963) Angeborenes und erworbenes im verhalten einiger sauger. Z.Tierpsychol 20, 705-754

FRASER D., KRAMER D. L., PAJOR E. A. & WEARY D. M. (1995) Conflict and cooperation: Sociobiological principles and the behaviour of pigs. Applied Animal Behaviour Science 44, 139-157

HECKT W. L., WIDOWSKI T. M., CURTIS S. E. & GONYOU H. W. (1988) Prepartum behavior of gilts in three farrowing environments. Journal of Animal Science 66, 1378

HEMSWORTH P., BRAND A. & WILLEMS P. (1981) The behavioural response of sows to the presence of human beings and its relation to productivity. Livestock Production Science 8, 67-74

JARVIS S., CALVERT S., STEVENSON J., VANLEEUWEN N. & LAWRENCE A. (2002) Pituitary-adrenal activation in pre-parturient pigs (sus scrofa) is associated with behavioural restriction due to lack of space rather than nesting substrate. Animal Welfare 11, 371-384

JARVIS S., LAWRENCE A., MCLEAN K., DEANS L., CHIRNSIDE J. & CALVERT S. (1997) The effect of environment on behavioural activity, ACTH, beta-endorphin and cortisol in pre-farrowing gilts. Animal Science (United Kingdom)

JARVIS S., MCLEAN K. A., CHIRNSIDE J., DEANS L. A., CALVERT S. K., MOLONY V. & LAWRENCE A. B. (1997) Opioid-mediated changes in nociceptive threshold during pregnancy and parturition in the sow. Pain 72, 153-159

JARVIS S., VAN DER VEGT B. J., LAWRENCE A. B., MCLEAN K. A., DEANS L. A., CHIRNSIDE J. & CALVERT S. K. (2001) The effect of parity and environmental restriction on behavioural and physiological responses of pre-parturient pigs. Applied Animal Behaviour Science 71, 203-216

JARVIS S., LAWRENCE A. B., MCLEAN K. A., CHIRNSIDE J., DEANS L. A. & CALVERT S. K. (1998) The effect of environment on plasma cortisol and β-endorphin in the parturient pig and the involvement of endogenous opioids. Animal Reproduction Science 52, 139-151

JENSEN P. (1993) Nest building in domestic sows: The role of external stimuli. Animal Behaviour 45, 351-358

JENSEN P. (1988) Diurnal rhythm of bar-biting in relation to other behaviour in pregnant sows. Applied Animal Behaviour Science 21, 337-346

JENSEN P., VESTERGAARD K. & ALGERS B. (1993) Nestbuilding in free-ranging domestic sows. Applied Animal Behaviour Science 38, 245-256

JENSEN P. (1989) Nest site choice and nest building of free-ranging domestic pigs due to farrow. Applied Animal Behaviour Science 22, 13-21

LAWRENCE A., PETHERICK J., MCLEAN K., DEANS L., CHIRNSIDE J., GAUGHAN A., CLUTTON E. & TERLOUW E. (1994) The effect of environment on behaviour, plasma cortisol and prolactin in parturient sows. Applied Animal Behaviour Science 39, 313-330

MEUNIER-SALAÜN M., GORT F., PRUNIER A. & SCHOUTEN W. (1991) Behavioural patterns and progesterone, cortisol and prolactin levels around parturition in european (large-white) and chinese (meishan) sows. Applied Animal Behaviour Science (Netherlands)

POE JR E. (1960) Round stall for farrowing. Nebraska Exp.Sta.Q 7, 12

ROTA NODARI S., CANDOTTI P., CEVIDALLI A.C. (2006) Prova comparativa di dolorabilità di Ecomectin rispetto ad altri endectocidi iniettabili. Atti del XXXIII Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini 121-130

RUIS M. A. W., TE BRAKE J. H. A., ENGEL B., EKKEL E. D., BUIST W. G., BLOKHUIS H. J., KOOLHAAS J. M. (1997) The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. Physiology & Behaviour 62, 623-630

SVC. The welfare of intensively kept pigs. doc XXIV/B3/ScVC/0005/1997. report of the scientific veterinary committee adopted 30 september 1997: European commission.report on the welfare of intensively kept pig.

THODBERG K., JENSEN K. H., HERSKIN M. S. & JØRGENSEN E. (1999) Influence of environmental stimuli on nest building and farrowing behaviour in domestic sows. Applied Animal Behaviour Science 63, 131-144

VON BORELL E., DOBSON H. & PRUNIER A. (2007) Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. Hormones and Behavior 52, 130-138

WIDOWSKI T., CURTIS S., DZIUK P., WAGNER W. & SHERWOOD O. (1990) Behavioral and endocrine responses of sows to prostaglandin F2 alpha and cloprostenol. Biology of Reproduction 43, 290.

CALIER ITALIA srl - VIA FRAPOLLI 21 - 20133 MILANO
TEL. 02 87 39 20 38 - FAX 02 87 39 20 74
INFO@CALIER.IT - WWW.CALIER.IT

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ANTIBIOTICI SULLA FLORA BATTERICA FECALE IN SUINETTI SVEZZATI AFFETTI DA SINDROME DI DEPERIMENTO

EFFECT OF ANTIBIOTICS' ADMINISTRATION ON FAECAL MICROFLORA IN WEANLING PIGS AFFECTED BY A WASTING SYNDROME

CANDOTTI, P., MERIALDI, G., GUERRA, O., NASSUATO, C., ROTA NODARI, S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia, Italia

Parole chiave: suino, svezzamento, carica batterica fecale, antibiotici, mangimi medicati.
Key words: pig, weaning, faecal bacterial count, antibiotics, medicated feeds.

Riassunto:
Lo studio è stato condotto in 11 allevamenti di suini in cui gli animali presentavano nel settore svezzamento sintomi di malattia clinicamente riferibile a sindrome del deperimento progressivo multisistemico post-svezzamento del suino (PMWS). In ciascun allevamento sono stati prelevati campioni di materiale fecale da 10 animali affetti dai segni clinici tipici della malattia. Sui campioni di feci è stata eseguita in campo un'analisi visiva della consistenza e della qualità e in laboratorio una quantificazione delle componenti batteriche fecali (carica batterica totale, streptococchi fecali, coliformi fecali, *Escherichia coli*) valutando se la somministrazione orale di antibiotici (amoxicillina e/o colistina) avesse influenzato tali parametri.
Rispetto ai valori riportati in letteratura in soggetti sani, sono stati rilevati livelli di coliformi tendenzialmente maggiori, mentre la carica batterica totale rientrava nei limiti citati.
Non sono risultate associazioni statisticamente significative tra i parametri indagati e il trattamento.

Abstract:
A survey was performed in eleven pig farms with a post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In each farm faecal samples were collected from 10 weaner pigs with clinical signs of the disease. A visual examination of faecal samples was performed on farm and different bacterial counts (total bacterial count, faecal streptococci, faecal coliformi and *Escherichia coli*) were determined in laboratory. The effect of orally administered antibiotics (amoxicillin and/or colistin) on these parameters was studied as well.
Compared with data in literature, coliforms were tendentially higher while total bacterial counts were into ranges reported.
Antibiotics did not significantly affect the bacterial counts examined.

INTRODUZIONE

L'apparato gastrointestinale degli animali vertebrati ospita una numerosa, dinamica ed eterogenea popolazione microbica non patogena in cui sono rappresentati tutti i principali gruppi di microrganismi, principalmente batteri, soprattutto Gram positivi (Savage, 1977; Mackie et al., 1999).
Nei suini si ritiene sia presente una concentrazione pari a 10^9 batteri per grammo di contenuto

nell'intestino tenue e fino a 10^{11} nel grosso intestino (cieco e colon) (Smith et al, 1963; Gaskins et al., 2002). I principali generi rappresentati comprendono *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Selenomonas*, *Clostridium* e *Escherichia* (Konstantinov et al., 2004; Moore et al. 1987; Salanitro et al., 1977; Smith et al., 1963).

La popolazione microbica gastrointestinale svolge un ruolo complesso e importante nella nutrizione e nella crescita degli animali, che non è stato ancora completamente chiarito (Dibner et al. 2002; Jensen, 1998; Zoetendal et al., 2004). Si ritiene che la microflora enterica eserciti una forte influenza su processi immunologici, nutrizionali e fisiologici e che il suo equilibrio sia fondamentale per il benessere dell'intestino e quindi dell'ospite (Hillman, 2004; Salminen et al., 1998; Savage, 1977; Umesaki et al., 2000), ma che possa anche avere effetti negativi sull'accrescimento degli animali da reddito a causa della competizione con l'ospite per i nutrienti, della produzione di metabolici tossici e dell'aumentata attività secretoria necessaria per la produzione di muco, in particolare a livello di intestino tenue (Collier et al., 2003; Kelly et al., 2001).

L'evolversi delle diverse popolazioni batteriche è condizionato da svariati fattori tra cui componenti ambientali e alimentari e variazioni fisiologiche nell'ospite (Hillman, 2004; Savage, 1977; Mackie et al., 1999; Konstantinov et al., 2004). Negli animali da reddito l'equilibrio della microflora intestinale e i suoi effetti sulla digeribilità e sulle performance vengono in parte regolati mediante l'utilizzo di basse dosi di antibiotici (Dibner et al., 2002; Gaskins et al., 2002; Jensen, 1998; Serratosa et al., 2006), la cui azione antimicrobica porta a una migliore assimilazione di proteine ed energia (Dibner et al., 2002; Gaskins et al., 2002).

È stato ampiamente dimostrato che nel periodo immediatamente successivo allo svezzamento si verificano modificazioni significative nella composizione della popolazione microbica intestinale (Konstantonov et al., 2006). Un trattamento antibiotico in questa fase, critica per l'apparato gastroenterico del suinetto che deve adattarsi a una dieta di composizione fisica e chimica diversa, meno digeribile e biodisponibile (Melin et al., 1997; Pluske, 2001), può favorire uno squilibrio del complesso ecosistema microbico, con aumento di popolazioni potenzialmente patogene (Hillman, 2004; Konstatinov et al., 2006; Savage, 1977) o indebolimento della risposta immunitaria dell'ospite (Collier et al, 2003; Kelly et al., 2001).

Una migliore comprensione del ruolo della microflora gastrointestinale permetterebbe di regolarne gli effetti su nutrizione, crescita, salute e malattie. Misurazioni dirette della componente microbica enterica possono essere eseguite solo dopo la morte dell'ospite, che è seguita peraltro da rapide modificazioni nel tratto alimentare e nella sua microflora. Ciò rende necessario, per realizzare studi attendibili, ricorrere ad animali vivi, appositamente sacrificati e immediatamente esaminati (Smith et al., 1963). Una valida alternativa è costituita dalla determinazione delle cariche microbiche fecali, che si ritiene siano sufficientemente indicative della popolazione microbica di cieco e colon (Fuller et al., 1960, Hillman, 2004; Savage, 1977; Willingale et al., 1955) e consentano di valutare l'equilibrio dei principali gruppi batterici della flora commensale intestinale (Hillman, 2004).

L'utilizzo di antibiotici addizionati ai mangimi è una pratica comune negli allevamenti suinicoli (Cromwell G.L., 2002; Jensen, 1998; Casappa et al., 2007) per il trattamento profilattico e terapeutico di diverse malattie (Bosi et al., 2009; Casappa et al., 2007). Tra i principi maggiormente utilizzati in fase di svezzamento, in forma singola o associata, sono colistina, tetracicline, ampicillina e amoxicillina, principalmente per il controllo di forme enteriche e respiratorie (Gervasi, 1998).

Colistina e amoxicillina sono risultati gli antibiotici più utilizzati anche nelle aziende incluse in questo studio. L'uso molto diffuso è uno dei motivi per cui il lavoro è stato focalizzato su queste due sostanze. Inoltre entrambe esplicano azione battericida, portando a degradazione della parete dei batteri Gram negativi e al rilascio di lipopolisaccaridi

(LPS) nell'ambiente in cui i batteri si trovano.
La sindrome del deperimento progressivo multisistemico post-svezzamento del suino (*Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*) è una patologia con elevato impatto sanitario ed economico, ormai diffusa in tutto il mondo. La diarrea, ritenuta tra le prime cause di perdite economiche nel settore svezzamento (Konstantinov et al., 2006), è uno dei sintomi più comuni, alla base della diagnosi clinica di PMWS insieme a deperimento, aumento dei linfonodi inguinali, pallore, ittero (Harding, 2000; Harding, 2004). Sebbene generalmente non rilevabili tutte in un singolo animale, le sei manifestazioni più caratteristiche della malattia sono tutte presenti in un'azienda clinicamente infetta (Harding, 2000; Harding, 2004).
L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la presenza di diarrea e le cariche microbiche fecali in suini con sintomatologia clinica di PMWS e l'impatto della somministrazione orale di antibiotici (amoxicillina e/o colistina) sulla composizione della microflora fecale.

MATERIALI E METODI

Allevamenti e animali

Per la prova sono stati selezionati animali appartenenti ad allevamenti clinicamente identificati come affetti da PMWS (allevamenti selezionati in seno al Progetto di Ricerca Corrente 16/2004).
All'interno di ciascun allevamento, sono stati selezionati 10 animali in fase di svezzamento, tra i 50 e i 105 giorni di vita, che clinicamente manifestassero i sintomi e i segni tipici della PMWS e non fossero affetti da altre patologie concomitanti. Da ogni singolo animale si è proceduto al campionamento di feci, attraverso defecazione spontanea o prelievo dall'ampolla rettale con guanto sterile monouso. I campioni fecali sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione (4 ± 2°C) fino alla processazione in laboratorio, che è avvenuta entro 24 ore dal prelievo.

Valutazione delle feci

Le feci sono state raccolte singolarmente in un contenitore sterile trasparente. Dopo la raccolta le feci sono state esaminate visivamente ed è stato loro attribuito il seguente punteggio: 0: normali; 1: aumento della viscosità; 2: molli; 3: liquide; 4: acquose.
Sono state considerate diarroiche le feci con punteggio pari o superiore a 2. In tabella 1 è indicato, per ciascuna azienda, la percentuale di animali con feci diarroiche.

Tabella 1: Percentuale di diarrea rilevata per azienda
Table 1: Percentage of diarrhoea per farm

allevamento	**età animali**	**medicazione**		**feci diarroiche**
		amoxicillina	***colistina***	
A	105	NO	NO	60%
B	50	NO	NO	10%
C	75	NO	NO	40%
D	65	NO	NO	50%
E	60	NO	NO	10%
F	67	SI	SI	50%
G	65	SI	SI	60%
H	83	SI	SI	40%
I	60	SI	SI	90%
L	70	NO	SI	30%
M	90	NO	SI	20%

Analisi di laboratorio
Da ciascun campione di feci sono state realizzate diluizioni seriali da 10^{-1} a 10^{-8} in soluzione diluente di Ringer.
Sono stati utilizzati i seguenti terreni:
- Tryptone Glucose Yeast Agar (Plate Count Agar: PCA) per la determinazione della carica batterica totale (CBT),
- Kanamycin Aesculin Azide agar base (KAA) per la conta degli Streptococchi fecali (S.F.),
- Triptone Bile-Glucuronid medium (TBX) per la conta dei coliformi fecali (C.F.) e di *Escherichia coli*,
- Agar sangue per la ricerca di ceppi emolitici di *E. coli*.

Le piastre di PCA, TBX e KAA sono state suddivise in quattro quadranti. Per ogni diluizione sono state pertanto utilizzate due piastre, che sono state poi allestite trasferendo con una micropipetta 20 μl di ogni diluizione sul corrispondente quadrante di ciascun terreno. Quindi si lasciavano asciugare per circa 15 minuti a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare.
I terreni PCA, KAA e Agar sangue sono stati incubati a 37 ± 1°C, il TBX è stato incubato a 42 ± 1°C. Le piastre sono state incubate capovolte per 48 ore, a eccezione dell'agar sangue per il quale l'incubazione è stata di 24 ore. Al termine del previsto periodo di incubazione è stata presa in considerazione la diluizione che, seminata sulle piastre, aveva dato luogo alle crescita di colonie in quantità numerabile. Nella lettura delle piastre di KAA sono state conteggiate le colonie caratteristiche di S.F., tonde, di colore bianco-grigiastro, con diametro di circa 2 mm, circondate da un alone bruno-nerastro di almeno 1 cm di diametro. Nella lettura delle piastre di TBX venivano conteggiate tutte le colonie (C.F.) e la frazione delle stesse di colore blu/blu-verde (*E. coli*). Le colonie emolitiche cresciute su Agar sangue sono state testate mediante agglutinazione rapida su vetrino per individuare i ceppi k 88+.
La CBT, il numero di S.F. e il numero di C.F. per grammo di feci (N/g), sono stati calcolati usando la seguente formula:

$$N/g = n / D \times V$$

in cui n è il numero delle colonie contate, D è la diluizione decimale alla quale sono state contate le colonie, V è il volume dell'inoculo (20 µl = 1/50 di millilitro).
Quando non c'è stata crescita batterica alla diluizione più bassa (10^{-1}) il risultato è stato espresso come N/g = <500, valore che si ha in caso dello sviluppo di una sola colonia alla diluizione 10^{-1}.

Analisi statistica
L'effetto del trattamento con amoxicillina e/o colistina sui parametri di interesse (CBT, streptococchi fecali, coliformi fecali, *E. coli* e *E. coli* emolitico) è stato indagato mediante un'analisi della varianza per misure ripetute applicando un modello lineare a effetti misti con la variabile identificativa dell'allevamento come effetto random.
L'effetto del trattamento sulla consistenza delle feci è stato testato sia mediante un modello lineare sia mediante Kruskal Wallis rank sum test.
Sono stati considerati indicativi di significatività statistica valori di p-value inferiori a 0.05.
L'analisi statistica è stata effettuata con il software open-source R (versione 2.8.1).

RISULTATI

I risultati delle analisi eseguite sono riportati in tabella 2. Gli esiti degli esami batteriologici sono espressi come media e deviazione standard (DS). I risultati sono suddivisi sulla base

dell'integrazione antibiotica (nessuna; colistina; colistina e amoxicillina) ricevuta nella settimana precedente al prelievo.

Tabella 2: Risultati dell'esame batteriologico fecale
Table 2: Faecal bacterial counts

Azienda	Carica batterica totale (ufc/g)		Streptococchi fecali (ufc/g)		Coliformi fecali (ufc/g)		*Escherichia coli* (ufc/g)		*E. coli* emolitico	Diarrea
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS		
Trattamento 1										
A	$3.25x10^{11}$	$1.03x10^{12}$	$1.79x10^{4}$	$3.06x10^{4}$	$1.30x10^{11}$	$4.11x10^{11}$	$1.30x10^{11}$	$4.11x10^{11}$	20%	60%
B	$1.14x10^{9}$	$1.09x10^{9}$	$5.00x10^{2}$	0.00	$6.12x10^{7}$	$1.23x10^{8}$	$5.96x10^{7}$	$1.24x10^{8}$	0%	10%
C	$2.13x10^{9}$	$6.11x10^{9}$	$4.54x10^{5}$	$1.42x10^{6}$	$8.09x10^{8}$	$2.35x10^{9}$	$5.44x10^{7}$	$1.40x10^{8}$	20%	40%
D	$5.31x10^{8}$	$1.09x10^{9}$	$5.95x10^{3}$	$1.55x10^{4}$	$7.50x10^{6}$	$1.69x10^{7}$	$7.50x10^{6}$	$1.69x10^{7}$	0%	50%
E	$1.23x10^{8}$	$1.30x10^{8}$	$1.20x10^{4}$	$1.35x10^{4}$	$1.01x10^{7}$	$3.16x10^{7}$	$5.00x10^{2}$	0.00	0%	10%
Trattamento 2										
F	$1.62x10^{7}$	$2.70x10^{7}$	$1.63x10^{6}$	$4.71x10^{6}$	$6.31x10^{6}$	$1.89x10^{7}$	$1.45x10^{5}$	$2.09x10^{5}$	0%	50%
G	$3.10x10^{9}$	$3.77x10^{9}$	$2.13x10^{4}$	$3.24x10^{4}$	$1.32x10^{8}$	$2.63x10^{8}$	$1.31x10^{8}$	$2.63x10^{8}$	10%	60%
H	$1.63x10^{6}$	$1.89x10^{6}$	$2.60x10^{3}$	$2.88x10^{3}$	$1.34x10^{5}$	$2.22x10^{5}$	$1.00x10^{5}$	$1.76x10^{5}$	0%	40%
I	$3.81x10^{8}$	$5.91x10^{8}$	$3.11x10^{5}$	$4.30x10^{5}$	$9.51x10^{7}$	$1.29x10^{8}$	$6.86x10^{7}$	$9.28x10^{7}$	0%	90%
Trattamento 3										
L	$3.48x10^{7}$	$3.92x10^{7}$	$2.28x10^{4}$	$4.08x10^{4}$	$5.38x10^{6}$	$1.07x10^{7}$	$1.86x10^{6}$	$2.61x10^{6}$	0%	30%
M	$1.71x10^{9}$	$4.67x10^{9}$	$1.56x10^{6}$	$4.73x10^{6}$	$4.17x10^{8}$	$1.26x10^{9}$	$4.17x10^{8}$	$1.26x10^{9}$	0%	20%
Totale										
	$3.04x10^{10}$	**$3.10x10^{11}$**	**$3.67x10^{5}$**	**$2.05x10^{6}$**	**$1.20x10^{10}$**	**$1.24x10^{11}$**	**$1.19x10^{10}$**	**$1.24x10^{11}$**	**4.5%**	**39%**

Legenda: ufc/g = unità formanti colonia per grammo di feci
Trattamento 1= nessuna somministrazione di amoxicillina o colistina nella settimana precedente il prelievo
Trattamento 2= somministrazione sia di amoxicillina che di colistina nella settimana precedente il prelievo
Trattamento 3= somministrazione di colistina ma non di amoxicillina nella settimana precedente il prelievo

Legend: ufc/g = colony forming unit per gram of faeces
Treatment 1= neither amoxicillin nor colistin administered the week before sampling
Treatment 2= both amoxicillin and colistin administered the week before sampling
Treatment 3= colistin but not amoxicillin administered the week before sampling

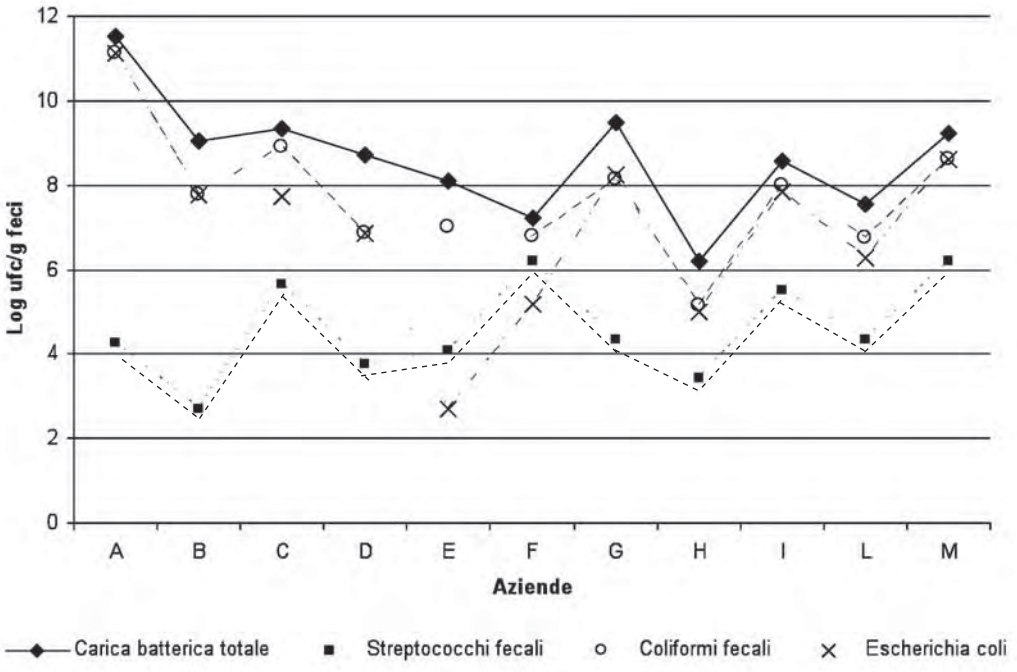
In tre aziende è stata rilevata presenza di *E. coli* emolitico: in 2 suini nelle aziende A e C e in un solo animale nell'azienda G. *E. coli* K88 non è stato individuato in nessuno degli animali esaminati.
In tabella 3 sono sintetizzati i valori minimo e massimo rilevati per ciascuna delle componenti batteriche valutate.

Tabella 3: Valori minimo e massimo delle cariche batteriche misurate
Table 3: Minimum and maximum values of faecal bacterial counts

	Carica batterica totale (ufg/g)	**Streptococchi fecali (ufc/g)**	**Coliformi fecali (ufc/g)**	***Escherichia coli* (ufc/g)**
valore minimo	$1.63x10^{6} \pm 1.89x10^{6}$	< 500	$1.34x10^{5} \pm 2.22x10^{5}$	< 500
valore massimo	$3.25x10^{11} \pm 1.03x10^{12}$	$1.63x10^{6} \pm 4.71x10^{6}$	$1.30x10^{11} \pm 4.11x10^{11}$	$1.30x10^{11} \pm 4.11x10^{11}$

Nel grafico 1 i risultati sono espressi come logaritmo in base 10 dei valori medi misurati.

Grafico 1: Valori medi delle cariche batteriche per azienda
Figure 1: Mean values of faecal bacterial counts per farm



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi di trattamento indagati per nessuno dei parametri studiati, ovvero il trattamento antibiotico orale o meno degli animali con colistina e/o amoxicillina non ha influenzato in modo significativo i parametri indagati. L'analisi statistica non ha evidenziato una correlazione tra il punteggio di diarrea attribuito visivamente e i parametri indagati in laboratorio. Tuttavia si evidenzia come il numero di coliformi, in gran parte rappresentati da *E. coli*, tende a essere più elevato di quanto ci si aspetterebbe in soggetti sani. Vari autori infatti hanno rilevato che gli elevati livelli di *E. coli*, clostridi e streptococchi (fino a 10^8-10^9ufc/g) che caratterizzano le feci dei suinetti nei primi giorni di vita (Konstantinov et al., 2006; Kvarnfors et al., 1972; Melin et al., 1997; Smith et al., 1963), diminuiscono progressivamente con l'età (Melin et al., 1997; Smith et al., 1961) e che dopo lo svezzamento si osserva una significativa riduzione degli anaerobi facoltativi, quali *E. coli* e streptococchi (Konstantinov et al., 2004; Melin et al., 1997; Savage, 1977). Melin et al. (1997) hanno osservato un calo di *E. coli* ed enterococchi in suinetti sani da 10^8ufc/g di feci a 7 giorni di vita fino a 10^5 a 63 giorni. In particolare, il valore più elevato di coliformi ed *E. coli* ($1.30x10^{11}$ufc/g) è stato registrato negli animali dell'azienda A, che sono quelli di età maggiore (105 giorni).

La differenza statisticamente significativa evidenziata dall'analisi tra le cariche batteriche misurate in funzione dell'allevamento conferma che la composizione della flora commensale intestinale è fortemente influenzata da molteplici fattori tra cui la carica batterica ambientale, la flora microbica materna e le scelte alimentari e manageriali che caratterizzano le diverse aziende. In una fase delicata come lo svezzamento, è importante tenere conto di tutti i fattori che possono influenzare l'equilibrio della microflora intestinale, compresi gli interventi profilattici e terapeutici volti a risolvere disturbi dell'apparato gastrointestinale dei suini.

BIBLIOGRAFIA

Bosi P., Merialdi G., Bardasi L., Scandurra S., Vecchi M., Ferro P., Messori S., Nisi I., Casini L., Trevisi P. (2009) "Effetto della somministrazione di tre diversi antibiotici sull'ecologia intestinale e su alcuni parametri produttivi di suinetti in svezzamento: dati preliminari". in: "Atti della Società italiana di patologia ed allevamento dei suini - XXXV Meeting Annuale" Modena, 12-13 Marzo 2009, 219-228.

Casappa, P., Camoni C., Zanichelli, C. (2007) "Uso strategico della medicazione in suinicoltura: i mangimi medicati". Riv. Zoot. Vet. 37, 55-65.

Collier C.T., Smiricky-Tjardes M.R., Albin D.M., Wubben J.E., Gabert V.M., Deplancke B., Bane D., Anderson D.B.G., HR. (2003) "Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters". J. Anim. Sci. 81, 3035-3045.

Cromwell G.L. (2002) "Why and how antibiotics are used in swine production". Anim. Biotechnol. 13, 7-27.

Dibner J.J., Buttin P. (2002) "Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism". J. Appl. Poult. Res. 11, 453-463.

Fuller R., Newland L.G.M., Briggs C.A.E., Braude R., Mitchell K.G. (1960) "The normal intestinal flora of the pig. IV. the effect of dietary supplements of penicillin, chlortetracycline or copper sulphate on the faecal flora". J. Appl. Microbiol. 23, 195-205.

Gaskins H.R., Collier C.T., Anderson D.B. (2002) “Antibiotics as growth promotants: Mode of action”. Anim. Biotechnol. 13, 29-42.
Gervasi E. (1998) “Mangimi medicati e allevamento intensivo”. in: “Atti della Società italiana di patologia ed allevamento dei suini - XXIV Meeting annuale”, 13-16.

Harding J.C.S. (2000) “Sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). Aspetti clinici, epidemiologia e diagnosi”. in: “Atti della Società italiana di patologia ed allevamento dei suini - XXVI Meeting annuale”, 77-86.

Harding J.C.S. (2004) “The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2”. Vet. Microbiol. 98, 131-135.

Hillman K. (2004) “Gut microbial ecology and quorum sensing”. Pig Journal. 54, 171-178.

Jensen B.B. (1998) “The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs”. J. Anim. Feed Sci. 7, 45-64.

Kelly D., King T.P. (2001) “Luminal bacteria: regulation of gut function and immunity” in: Piva A., Bach Knudsen K. E., Lindberg J. E. “Gut Environment of Pigs”, Nottingham, UK, Nottingham University Press, 113-132.

Konstantinov S.R., Awati A.A., Williams B.A., Miller B.G., Jones P., Stokes C.R., Akkermans A.D.L., Smidt H., de Vos W.M. (2006) “Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities”. Environ. Microbiol. 8, 1191-1199.

Konstantinov S.R., Favier C.F., Zhu W.Y., Williams B.A., Klüß J., Souffrant W.B., de Vos W.M., Akkermans A.D.L., Smidt H. (2004) “Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition”. Anim Res. 53, 317-324.

Kvarnfors E., Mansson I. (1972) “The intestinal flora of pigs with special reference to clostridium perfringens”. Nord. Vet. Med. 24, 567-576.

Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. (1999) “Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract”. Am. J. Clin. Nutr. 69, 1035S-1045S.

Melin L., Jensen-Waern M., Johannisson A., Ederoth M., Katouli M., Wallgren P. (1997) “Development of selected faecal microfloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs”. Vet. Microbiol. 54, 287-300.

Moore W.E., Moore L.V., Cato E.P., Wilkins T.D., Kornegay E.T. (1987) “Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine”. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1638-1644.

Pluske J.R. (2001) “Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig”. in: Piva A., Bach Knudsen K. E., Lindberg J. E. “Gut Environment of Pigs”, Nottingham, UK, Nottingham University Press, 1-28.

Progetto di ricerca corrente IZSLER 16/2004 “Studio di determinanti virali e non virali (lps sierici, citochine infiammatorie, componenti batteriche) nelle sindromi di deperimento del suino in corso di focolai spontanei”. Responsabile scientifico: dott. Paolo Candotti.

Salanitro J.P., Blake I.G., Muirhead P.A. (1977) “Isolation and identification of faecal bacteria from adult swine”. Appl. Environ. Microbiol. 33, 79-84.
Salminen S., Ouwehand A.C., Isolauri E., (1998). “Clinical applications of probiotic bacteria” Int. Dairy J. 8, 563–572.

Savage D.C. (1977) “Microbial ecology of the gastrointestinal tract”. Ann. Rev. Microbiol. 31, 107-133.

Serratosa J., Blass A., Rigau B., Mongrell B., Rigau T., Tortadès M., Tolosa E., Aguilar C., Ribó O., Balagué J. (2006) “Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective”. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 25, 637-650.

Smith H.W., Crabb W.E. (1961) “The faecal bacterial flora of animals and man: Its development in the young”. J. Pathol. Bacteriol. 82, 53-66.

Smith H.W., Jones J.E. (1963) “Observations on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs”. J. Pathol. Bacteriol. 86, 387-412.

Umesaki Y., Setoyama H. (2000) “Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model”. Microb. Infect. 2, 1343-1351.

Willingale J.M., Briggs C.A.E. (1955) “The normal intestinal flora of the pig II: quantitative bacteriological studies”. J. Appl. Microbiol. 18, 284-293.

Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R. (2004) “Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review”. J. Nutr. 134, 465-472.

SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI DI ISOLATI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE e BRACHYSPIRA PILOSICOLI* DA CASI DI ENTERITE DEL MAGRONAGGIO-INGRASSO IN ALLEVAMENTI ITALIANI

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE AND BRACHYSPIRA PILOSICOLI ISOLATES FROM CASES OF ENTERITIS OF FATTENERS AND GROWERS IN ITALIAN SWINE HERDS

MAGISTRALI, C.F., CUCCO, L., D'AVINO, N., PANICCIA', M., NERI, MC., PEZZOTTI, G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy;

PAROLE CHIAVE: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, metodo, breakpoint
KEY WORDS: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, method, breakpoint

RIASSUNTO
Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la sensibilità agli antimicrobici di isolati di *Brachyspira hyodysenteriae e Brachyspira pilosicoli* da casi di enterite del magronaggio e ingrasso in allevamenti italiani. Gli isolati sono stati ottenuti attraverso due diversi metodi di campionamento: attivo, da suini affetti da dissenteria suina, e passivo, dalle collezioni batteriche di laboratori diagnostici. Il campionamento attivo ha interessato 39 allevamenti a diverso indirizzo produttivo, dai quali sono stati caratterizzati 30 ceppi di *B. hyodysenteriae* e 9 ceppi di *B. pilosicoli* . Attraverso il campionamento passivo sono invece stati esaminati 27 stipiti di *B. hyodysenteriae*. Tutti i ceppi sono stati testati attraverso il metodo di diluizione in brodo. I risultati hanno mostrato una diffusa resistenza a tilosina, sia dal campionamento attivo sia da quello passivo, mentre la maggior parte degli stipiti ha mostrato esito intermedio per lincomicina. Per quanto riguarda le pleuromutiline, tiamulina e valnemulina, nessun ceppo di *B. hyodysenteriae* del campionamento attivo è risultato resistente. La presenza di ceppi di *B. hyodysenteriae* multi - resistenti è stata confermata attraverso il campionamento passivo. Dei 9 ceppi di *B. pilosicoli*, 3 sono risultati resistenti anche alle pleuromutiline. Le differenze riscontrate tra campionamento attivo e passivo possono essere giustificate dalle diverse modalità di selezione del campione, dal momento che i casi pervenuti al laboratorio diagnostico sono generalmente caratterizzati da problematiche ricorrenti dissenteria suina.

ABSTRACT
The aim of this study was to assess antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli* from cases of enteritis of growers and fatteners from Italian pig herds. *B. hyodysenteriae* isolates were from two different sampling procedures: active sampling, from swine affected by enteritis, and passive sampling, from culture collections of diagnostic laboratories. Thirty isolates of *B. hyodysenteriae* and 9 isolates of *B. pilosicoli* were collected from 39 herds, of different holding types, by active sampling, while 27 were from passive sampling. All isolates were tested for antimicrobial susceptibility by a broth dilution

method. Results showed a widespread resistance to tylosin of the isolates from both active and passive sampling, while most of them resulted intermediate to lincomycin. Regarding pleuromutilins, tiamulin and valnemulin, no *B. hyodysenteriae* isolate from active sampling resulted resistant, but the presence of multi-resistant strains was confirmed by passive sampling. Three out of nine isolates of *B. pilosicoli* resulted resistant to pleuromutilins. Differences between active and passive sampling may be due to a selection of isolates by passive sampling, since they originated from farms with recurrent SD problems.

INTRODUZIONE

Brachyspira hyodysenteriae è l'agente della dissenteria suina (Swine Dysentery, SD), una patologia ben conosciuta, che tuttavia causa ancora notevoli danni economici negli allevamenti suini italiani. La spirochetosi intestinale suina, o Porcine intestinal Spirochetosis (PIS), sostenuta da *B. pilosicoli*, è stata segnalata in Italia, e si caratterizza per una minore gravità clinica (Bonilauri, 2004). Il controllo della SD in allevamento è tradizionalmente legato all'impiego di antimicrobici, che sono utilizzati con successo anche in corso di programmi di eradicazione. Nel corso degli anni, sono stati consigliati diversi farmaci, tra i quali carbadox, dimetridazolo, tilosina, pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e lincomicina (Harris, 1999). Alcuni di questi antimicrobici sono stati però recentemente esclusi dall'impiego in zootecnia, a causa di potenziale effetto negativo per la salute umana, mentre altri sono stati progressivamente abbandonati per l'insorgenza di resistenze. Le pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e la lincomicina sono quindi i più importanti composti per il trattamento delle infezioni da *B. hyodysenteriae*. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, sono state segnalate resistenze anche nei confronti di questi antibiotici, resistenze che hanno destato notevole preoccupazione tra gli operatori del settore (Grasham, 1998; Karlsson, 2002; Karlsson, 2003; Karlsson, 2004; Bonilauri, 2004). In questo contesto, è importante valutare l'andamento della sensibilità agli antimicrobici di questa specie batterica.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare quindi la sensibilità agli antimicrobici di stipiti di *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* isolati da allevamenti suini italiani. Gli isolati sono stati ottenuti con due diverse modalità di campionamento: un campionamento attivo, svolto nelle aziende che presentavano sintomi indicativi di dissenteria suina, e un campionamento passivo, che ha interessato invece ceppi di *B. hyodysenteriae* provenienti dalle collezioni batteriche di laboratori diagnostici italiani. Tutti gli isolati sono stati valutati per la sensibilità agli antimicrobici mediante rilevo della minima concentrazione inibente (MIC) con lo stesso metodo, di diluizione in brodo.

MATERIALI E METODI

Campionamento passivo: ventisette ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da casi di dissenteria suina in allevamenti italiani sono stati utilizzati per lo studio. Gli isolati sono stati mantenuti in Microbank (Prolab Diagnostic, Richmond Hill, Canada) a -80°C fino al momento dell'analisi. In seguito, i ceppi sono stati seminati in Agar sangue al 5% sangue di montone, e incubati in anaerobiosi a 42°C per 3-5 giorni. Dopo l'incubazione, la purezza del ceppo è stata verificata mediante microscopia ottica.

Campionamento attivo: sono stati campionati 39 allevamenti di diverso indirizzo produttivo; contestualmente al prelievo di feci è stato compilato un questionario anamnestico, che ha raccolto dati relativi alla composizione dell'azienda e al gruppo di suini campionato, con particolare riferimento alla sintomatologia riscontrata e al tipo di trattamenti effettuato. Il 28% degli allevamenti era a ciclo aperto, il 33% di solo ingrasso, e il 39% a ciclo chiuso. Il numero medio di scrofe per allevamento era di 600, sia per il ciclo aperto sia per quello chiuso, mentre negli allevamenti all'ingrasso, il numero medio di suini era di 2550 l'anno. Per

quanto riguarda i trattamenti, nel 54% delle aziende, erano state impiegate pleuromutiline nella fase interessata dal campionamento o in quelle precedenti.
Calcolando una prevalenza attesa del 30%, è stato suggerito il prelievo di 9 campioni di feci da ciascun allevamento, da suini con sintomi suggestivi di SD o ospitati nello stesso box. I campioni di feci (n=342), mantenuti in condizioni di refrigerazione fino al momento dell'analisi, sono stati poi seminati su TSA-BJ agar a 41,5°C per cinque giorni in anaerobiosi. Le piastre che presentavano una crescita caratterizzata da emolisi sono state sottoposte a isolamento su Agar Sangue al 5% per 3-5 giorni a 41,5°C in anaerobiosi. Gli stipiti, dopo verifica della purezza in microscopia ottica, sono stati infine caratterizzati mediante PCR (Leser, 1997) per la definizione di specie. Gli isolati appartenenti alla specie *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* sono stati quindi sottoposti a test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici con metodo di diluizione in brodo, come descritto oltre. Per ogni allevamento positivo, è stato sottoposto al test almeno un isolato appartenente a ciascuna delle due specie.
Metodo di diluizione in brodo: è stato eseguito in conformità a quanto già descritto da Rohde (2004). In breve, ciascun isolato è stato seminato su Anaerobe Fastidious Agar (LAB-M Ltd, UK) in anaerobiosi a 41,5°C per 72 ore. Dopo un controllo di purezza in microscopia, il ceppo è stato sospeso in BHI, ad una concentrazione di 10^8 ufc/ml circa. 300 μl della sospensione sono stati quindi aggiunti a 30 mL di BHI+ calf fetal serum (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) , fino ad ottenere una concentrazione di 10^6 ufc/ml circa. 0,5 ml di questa sospensione sono stati seminati in ciascun pozzetto di piastra VetMIC Brachy (SVA, Uppsala, Sweden) e incubati in anaerobiosi a 37°C per quattro giorni con agitazione continua. Un ceppo di *Brachyspira hyodysenteriae* (ATCC 27164, B78) è stato impiegato come controllo (Pringle, 2006a). Le concentrazioni testate sono state le seguenti: tiamulina: 0.063 μg/ml; 0,125 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; 8 μg/ml. Valnemulina: 0.031 μg/ml; 0.063 μg/ml; 0,125 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; Lincomicina: 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; 8 μg/ml; 16 μg/ml; 32 μg/ml; 64 μg/ml. La lettura è avvenuta tramite visore ottico; La minima concentrazione inibente è stata definita sulla base della diluizione di antimicrobico più bassa in grado di inibire la crescita batterica.
Le interpretazioni dei valori di MIC per entrambi i test sono state effettuate sulla base dei valori di Breakpoint riportati da Ronne e Szancer (1990) : Tiamulina: ≤ 1 μg/ml: sensibile; >1- ≤4 μg/ml: intermedio; >4 μg/ml: resistente. Valnemulina: ≤ 1 μg/ml: sensibile; >1- ≤4 μg/ml: intermedio; >4 μg/ml: resistente. Lincomicina: ≤ 4 μg/ml, sensibile; >4- ≤36 μg/ml: intermedio; >36 μg/ml: resistente.

RISULTATI
Campionamento attivo: in 23 su 39 allevamenti esaminati (pari al 59,0%) è stata isolata *B. hyodysenteriae*; in 3 (7,7%) *B. pilosicoli*, mentre in un solo caso (2,6%) si sono isolate entrambe le specie. Per quanto riguarda i campioni di feci, 209 (61,1%) sono risultati positivi per *Brachyspira* spp. Da questi campioni sono stati isolati 184 stipiti, che alla caratterizzazione in PCR sono risultati appartenere alla specie *B. hyodysenteriae* (108, pari al 58,7%), mentre 11 (6,0 %) alla specie *B. pilosicoli* e 108 (51,2%); 65 isolati (35,3%) non sono invece risultati tipizzabili mediante PCR.

Esiti della valutazione della minima concentrazione inibente: in tabella 1 sono indicati i valori relativi agli esiti dei ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da campionamento attivo, mentre in tabella 2 sono riportati quelli relativi a *B. pilosicoli* sempre da campionamento attivo.
Infine, gli esiti delle determinazioni che si riferiscono ai ceppi di *B. hyodysenteriae* da campionamento passivo sono indicati in tabella 3.

Tabella 1: valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* da campionamento attivo (n=30). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.
Table 1: *MIC values of B. hyodysenteriae isolates from active sampling by Broth Dilution Method (n=30). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are shown in bold.*

Valori di MIC (μg/ml)													
Antibiotico	**0.031**	**0.063**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**
Tiamulina		2		6	7	11	4						
Valnemulina	3	4	2	1	3	8	9						
Lincomicina							1	5	4	6	**14**		
Tilosina												**1**	**29**

Tabella 2: valori di MIC degli isolati di *B. pilosicoli* da campionamento attivo (n=9). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.
Table 2: *MIC values of B. pilosicoli isolates from active sampling (n=9). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.*

Valori di MIC (μg/ml)													
Antibiotico	**0.031**	**0.063**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**
Tiamulina		1		1	1		2	1	**3**				
Valnemulina	1		1	1	1	1	1	**3**					
Lincomicina							2	3	1	3			
Tilosina							1	1					**6**

Tabella 3: valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* da campionamento passivo (n=27). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. Gli isolati resistenti sono indicati in grassetto.
Table 3: *MIC values of B. hyodysenteriae isolates from passive sampling (n=27). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.*

Valori di MIC (μg/ml)													
Antibiotico	**0.031**	**0.063**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**
Tiamulina		1	2	6	2	5	5	1	**5**				
Valnemulina	3	1	2	1	6	1	5	**8**					
Lincomicina						1	1	6	6	4	2	**7**	
Tilosina							2					**1**	**24**

DISCUSSIONE

L'elevata percentuale di allevamenti positivi per *B. hyodysenteriae* o *B. pilosicoli* conferma il buon potere predittivo dell'esame clinico per la diagnosi delle infezioni da *Brachyspira* spp. Per quanto riguarda la composizione di specie, *B. hyodysenteriae* appare essere maggiormente frequente rispetto a *B. pilosicoli*. Questo rilievo ricalca quanto già osservato in precedenza da altri autori in allevamenti italiani (Magistrali, 2005; Merialdi, 2002), anche se non è escluso che la maggiore gravità della sintomatologia osservabile in corso di dissenteria suina renda l' infezione da *B. hyodysenteriae* più facilmente rilevabile rispetto a *B. pilosicoli*.

In corso di dissenteria suina, inoltre, il numero di animali che effettivamente eliminano il batterio attraverso le feci appare essere piuttosto elevato, come confermato dall'elevata percentuale di campioni positivi all'esame batteriologico. Questo dato può essere d'aiuto qualora si desideri confermare il sospetto clinico contenendo i costi dell'accertamento diagnostico.

I dati che si riferiscono alla sensibilità agli antimicrobici rilevano la presenza di una diffusa resistenza a tilosina, che conferma quanto già accertato da altri autori (Ronne e Szancer, 1990; Molnar, 1996; Karlsson, 2003, Bonilauri 2004, Molnar, 1996), probabilmente legato ad un diffuso impiego di questa molecola in suinicoltura. La resistenza a tilosina è legata a una mutazione puntiforme del gene che codifica il 23S rRNA, ed insorge rapidamente in vitro, dopo 2 settimane circa di esposizione all'antimicrobico (Karlsson, 2003). Per quanto riguarda invece lincomicina, la maggior parte degli isolati testati si colloca su valori di sensibilità intermedia, con presenza di stipiti chiaramente resistenti o sensibili sia in campionamento attivo che passivo. Diverso il quadro che si riferisce alle pleuromutiline, vale a dire valnemulina e tiamulina. Innanzitutto, la sensibilità ai due antimicrobici cammina in parallelo: ceppi chiaramente sensibili a tiamulina lo sono anche a valnemulina e viceversa. Per quanto riguarda *B. pilosicoli*, nonostante il numero basso d'isolati, il quadro di sensibilità è differente rispetto a quello osservato in *B. hyodysenteriae*. Anche questo dato concorda con quanto osservato altrove: ad esempio in Svezia, dove non è stata mai registrata resistenza a tiamulina per *B. hyodysenteriae*, questa è stata rilevata per *B. pilosicoli* (Karlsson, 2004b; Pringle, 2006b).

Per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, con il campionamento attivo non è stato possibile individuare isolati resistenti a tiamulina e valnemulina, mentre la presenza di ceppi multi-resistenti è stata confermata dall'analisi dei risultati derivanti dal campionamento passivo. E' probabile che questa differenza sia legata al fatto che i ceppi del campionamento passivo derivano dall'attività diagnostica, con la quale si tende a individuare i casi ricorrenti o particolarmente problematici, ipotesi già peraltro indicata da altri autori (Bonilauri, 2004). Infatti, proprio la facilità della diagnosi predittiva che contraddistingue la dissenteria suina, di cui si parlato sopra, induce a eseguire i trattamenti in cieco, senza una conferma da parte del laboratorio diagnostico.

CONCLUSIONI

La sensibilità alle pleuromutiline di *B. hyodysenteriae* negli allevamenti italiani appare buona. La diffusione di ceppi resistenti deve essere contenuta attraverso l'implementazione della biosicurezza, per evitare l'introduzione di ceppi resistenti in allevamento, e dall'uso di protocolli terapeutici appropriati.

Il monitoraggio periodico degli stipiti presenti in azienda, con il rilievo dei valori di minima concentrazione inibente, rappresenta uno strumento chiave per prevenire ed arrestare la diffusione di ceppi multi-resistenti. Infatti, poiché la resistenza a tiamulina in *B. hyodysenteriae* si sviluppa gradualmente, l'analisi del valore quantitativo della MIC, seguito nel tempo, può essere di aiuto nel rilievo precoce delle situazioni potenzialmente problematiche.

BIBLIOGRAFIA

Bonilauri P., Merialdi G., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. (2004) "Incremento del riscontro di ceppi multiresistenti di *B. hyodysenteriae* in allevamenti suini del nord Italia". Atti della Società Italiana di patologia e allevamento del suino, XX Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme. 181-186.

Bonilauri, P., Merialdi, G., Perini, S., Vezzali, Dottori, M. (2002) "Primo isolamento di *Brachyspira pilosicoli* dal suino in Italia". Obiettivi e documenti Veterinari, 1: 15-19.

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 2004. "Method for Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria" sixth ed. Approved standards M11-A6. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Gresham A.C., Hunt B.W., Dalziel R.W. (1998) "Treatment of swine dysentery – problems of antibiotic resistance and concurrent salmonellosis ". Vet Rec 143, 619.

Harris D.L., Hampson D.J., Glock R.D. (1999) "Swine Dysentery". In: Straw B.E., D'Allaire A., Mengeling W.L., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 8th ed., Iowa State University Press. Ames, Iowa U.S.A., 579-600.

Karlsson M., Oxberry S.L., Hampson D.J. (2002) "Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method". Vet. Microbiol. 84, 123-133.

Karlsson M.; Fellstrom C., Gunnarsson A., Landen A., Franklin A. (2003) "Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates". Journal of Clinical Microbiology 41: 2596-2604.

Karlsson M., Aspan A., Landen A., Franklin A. (2004a) "Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with descreased susceptibility to tiamulin" Journal of Medical Microbiology. 53, 281-285.

Karlsson M., Fellstrom C., Johansson K.E., Franklin A. (2004b) " Antimicrobial resistance in *Brachyspira pilosicoli* with special reference to point mutation in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance". Microbial drug resistance. 10: 204-208.

Leser T. D., Møller K, Jensen TK, Jorsal SE.. (1997) "Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Molecular and Cellular probes (1997) 11, 363-372.

Magistrali C.F. (2005) "Enteriti del magronaggio e ingrasso: altre patologie causate dal genere *Brachyspira* e loro impatto". Atti Società Italiana di Patologia e Allevamento del Suino, XXXI meeting annuale, Mantova: 147-156.

Merialdi G., Bonilauri P., Granelli F., Perini S., Dottori M. (2002). Eziologia batterica e parassitaria di 82 casi di enterite nelle fasi di magronaggio e ingrasso con particolare riferimento alle infezioni da *Brachyspira* spp. Atti Società Italiana di patologia ed allevamento del suino.

Merialdi G., Bonilauri p., Granelli F., Luppi A., Dottori M. (2003) "Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy" Vet Rec 153: 529-530.

Molnar, L. (1996) Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemioteraputic drugs. Vet. Rec. 138: 158-160.

Pringle M., Asrestrup F.M., Bergsio B., Fossi M., Jouy E., Landen A., Mevius D., Perry K., Teale C., Thompson J., Skrzypczac T., Veldman K., Franklin A. (2006a) " Quality control ranges for antimicrobial susceptibility testing by broth dilution of the *Brachyspira hyodysenteriae* type strain (ATCC 27164)". Microbial Drug Resistance 12, 219-221.

Pringle M., Landen A., Franklin A. (2006b) "Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates" Research in Veterinary Science. 80: 1-4.

Rasback T., Fellstrom C., Bersgjo B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S.M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M. (2005). "Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test". Vet. Microbiol. 109, 229-243.

Rohde J., Kessler M., Baums C.G., Amtsberg G. (2004) "Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany". Vet. Microbiol. 102, 25-32.

Ronne H., Szancer J. (1990) "In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemiotherapeutics". In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland, 126.

INTRODUZIONE

I clostridi sono batteri Gram positivi, sporigeni e anaerobi obbligati. Le caratteristiche peculiari dei microrganismi appartenenti a questo genere sono rappresentate dalla capacità di produrre tossine, che a seconda del tipo sono in grado di provocare gravi danni tessutali e risultano essere i fattori determinanti nella patogenesi della malattia.

Nell'allevamento suino risultano di fondamentale importanza le forme enteriche sostenute da *Clostridium perfringens* tipo A e C e *Clostridium difficile* che colpiscono principalmente i soggetti giovani, con sistema immunitario immaturo, provocando gravi forme cliniche che possono concludersi con la morte dell'animale.

Clostridium perfringens viene considerato una delle principali cause di enterite negli animali domestici, in particolare l'infezione sostenuta da *Clostridium perfringens* tipo C è diffusa a livello mondiale e colpisce principalmente i suinetti durante la prima settimana di vita provocando un'enterite necrotico-emorragica, spesso ad esito fatale (Taylor D.J. et Bergeland M.E., 1996; Nigrelli A.D., 2009).

La malattia può presentarsi con diverse forme cliniche: per-acuta, acuta, sub-acuta e cronica.

Nella forma per-acuta colpisce i suinetti nelle prime 48 ore dalla nascita. Gli animali sviluppano una diarrea emorragica che li porta rapidamente a morte. In alcuni soggetti la morte si verifica, addirittura, prima della comparsa di diarrea e la carcassa di questi si presenta generalmente in buone condizioni generali.

Nella forma acuta i soggetti colpiti sopravvivono almeno due giorni dopo la comparsa dei sintomi e perciò la mortalità inizia dal terzo giorno di vita. Durante il decorso clinico le feci si presentano rosso-brunastre e contengono frustoli necrotici grigiastri.

Nella forma sub-acuta i suinetti presentano una diarrea persistente non emorragica che li porta a morte dopo un deperimento progressivo nell'arco di 5-7 giorni. Le feci, inizialmente giallastre, diventano successivamente liquide e chiare e contengono sia coaguli che frustoli necrotici.

La forma cronica colpisce generalmente suinetti di una o due settimane, ed è caratterizzata da una diarrea persistente con feci mucose e giallo-grigiastre che in alcuni casi formano delle caratteristiche concrezioni essiccate che ricoprono la coda. La morte può sopravvenire dopo diverse settimane, in ogni caso la crescita dei suinetti colpiti risulta gravemente penalizzata (Songer J.G. et al., 2005).

Le lesioni anatomopatologiche si riscontrano principalmente nel piccolo intestino, in particolare nel digiuno, anche se nei casi più gravi possono interessare l'intestino *in toto*. La mucosa intestinale presenta una colorazione rosso-nerastra e si presenta rivestita da pseudomembrane che microscopicamente appaiono costituite da cellule epiteliali necrotizzate, cellule infiammatorie, fibrina e un numero variabile di bacilli. Solitamente si osserva una estesa necrosi emorragica a carico della mucosa come pure della sottomucosa e della tonaca muscolare e la presenza di essudato emorragico nel lume intestinale.

L'esame colturale evidenzia generalmente un'elevata concentrazione di *C. perfringens* nel contenuto intestinale (Okazaki Y. et al., 1993; Songer J.G. and Uzal F.A., 2005).

Per la diagnosi di enterite da *Clostridium perfringens* è importante valutare il quadro sintomatologico, le lesioni anatomopatologiche ed i quadri microscopici. Le caratteristiche di riferimento risultano essere la diarrea emorragica nei lattonzoli, il tasso di mortalità riscontrato e la presenza di lesioni circoscritte di tipo necrotico-emorragico a livello di piccolo intestino (Taylor D.J. et Bergeland M.E., 1996; Sanz M.G. et al. 2005). La diagnosi viene confermata dall'isolamento e dalla quantificazione dell'agente eziologico, nonchè dalla dimostrazione delle specifiche tossine nel contenuto intestinale (Le Guennec J. et al., 2003). Tuttavia occorre sottolineare come non sia sempre possibile riscontrare la tossina preformata a causa della sua labilità alle proteasi (Taylor D.J., 2003).

Più recentemente sono stati individuati come responsabili di forme enteriche nei suinetti in sala-

parto anche ceppi di *C. perfringens* tipo A produttori di tossina β2. Le lesioni anatomopatologiche si possono presentare con livelli di gravità variabile e in taluni casi è possibile ritrovare quadri molto simili a quelli descritti per le infezioni da *C. perfringens* tipo C (Songer j.G. et al., 2004; Songer J.G. e Uzal F.A. 2005; Nigrelli A.D. 2009).
Nel presente lavoro si è ritenuto interessante riportare un caso di clostridiosi enterica in suinetti sottoscrofa, caratterizzato da un decorso e da quadri clinici ed anatomopatologici per alcuni aspetti atipici e di difficile interpretazione.

MATERIALI E METODI

Allevamento
Azienda suinicola collocata nella Pianura Padana, costituita da 530 scrofe di genetica ibrida inglese, gestita in banda bi-settimanale e a ciclo aperto. La rimonta è interna e il nucleo delle Gran Parentali viene ringiovanito annualmente grazie all'acquisto, in un unico conferimento, di scrofette di 7 kg di peso provenienti da nuclei ad elevato standard sanitario. Una banda di suinetti svezzati ogni 4 viene mantenuta in azienda sino al peso di 30kg, mentre le altre 3 vengono vendute al termine della lattazione ad un peso medio di circa 6,4 Kg capo.
Allo svezzamento le scrofe vengono alloggiate in gabbie gestazione, dove, dopo essere state stimolate e fecondate in presenza del verro, rimangono per alcune settimane. Fra il 21° ed il 28° giorno dall'inseminazione viene effettuata la diagnosi ecografica di gravidanza, a cui segue la fase di gestazione in box multipli della capacità massima di 8 capi. Circa 5 giorni prima della scadenza del termine della gestazione, le scrofe vengono trasferite nelle gabbie parto. La lattazione, così come previsto dalla rigidità del sistema in banda bisettimanale, è di 21 giorni.
Il mangime utilizzato, di tipo commerciale, viene somministrato seguendo la curva high-low-high, che prevede 2,8-2,5-3,0 Kg rispettivamente all'inizio (fino ai 40 giorni), a metà (dai 40 agli 80 giorni) e a fine gestazione (dagli 80 fino al giorno precedente il parto). Durante la prima settimana di lattazione vengono erogati due pasti giornalieri e, a partire dall'ottavo giorno, si passa a tre somministrazioni, per un apporto medio giornaliero di circa 6,5 Kg capo.
La distribuzione dell'acqua è affidata ad un silos di raccolta, tributario di un pozzo artesiano che, attraverso un sistema di tubazioni, raggiunge gli animali tramite abbeveratoi a spillo, eccezion fatta per la gestazione in gabbia ove è presente un truogolo lungo in cui viene sempre garantito un livello minimo d'acqua.
L'azienda, dove viene applicata una riforma volontaria al 7° parto, si distingue per l'elevata produttività (vedi tabella 1). A partire dal mese di dicembre 2008 veniva osservato in sala parto un aumento della mortalità nei suinetti, i cui aspetti clinici verranno trattati nel capitolo relativo ai risultati.

Tabella 1: Riepilogo produttivo annuale
Table 1: annual production summing up

Presenza media di scrofe	533,29	Numero di svezzati/Parto	11,49
Numero fecondazioni	1478	(%) mortalità in lattazione	9,67
(%) messa al parto	85,86	Parti/Scrofa/Anno	2,37
Numero di nati tot/Parto	13,51	Svezzati/Scrofa/Anno	27,28
Numero di nati vivi/Parto	12,72	(%) rimonta	65,07
(%) mortalità alla nascita	5,84		

Necroscopia
Quattordici suinetti e una scrofa morta in sala parto, sono stati conferiti, entro poche ore dalla morte presso la sezione di Reggio Emilia, (IZSLER) e sottoposti a necroscopia seguendo una tecnica standardizzata.

Esame batteriologico
Il contenuto intestinale e diversi organi, (fegato, milza e reni) sono stati prelevati per l'esecuzione di esami microbiologici, impiegando tre diversi terreni colturali, l'Agar sangue, l'Agar Siero e l'Hektoen Enteric Agar, terreno selettivo differenziale per le enterobatteriacee. L'incubazione è stata eseguita a 37°C per 48 ore in aerobiosi.
Inoltre, per l'isolamento di *C. perfringens,* diluizioni in soluzione fisiologica in base dieci del contenuto del piccolo intestino (da 10^{-2} fino a 10^{-8}) sono state spatolate su piastre di Agar Sangue in ragione di 0,1 ml. Successivamente le piastre sono state incubate in anaerobiosi a 37°C per 48 ore. La presenza di *C. perfringens* è stata considerata significativa se superiore a $1x\ 10^6$ ufc/g.
Le colonie con caratteri morfologici tipici per *C. perfringens* sono state sottoposte a test di conferma tramite la prova CAMP *reverse* in anaerobiosi, seguendo una metodica standardizzata (Hansen M.V. and Elliot L.P., 1980).
Il contenuto del colon è stato inviato presso la Sezione di Mantova (IZSLER) sia per la ricerca di *Clostridium difficile* tramite metodica microbiologica, sia per rilevare la presenza delle tossine A e B prodotte da questo clostridio, attraverso l'impiego di un kit ELISA presente in commercio (*Clostridium difficile* tox A/B II kit, TechLab) (Nardi et al., 2005).

Genotipizzazione
I ceppi di *Clostridium perfringens* isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione con metodica PCR multiplex in grado di rilevare, con un'unica prova, geni codificanti per le tossine α, β, ε, ι, $\beta 2$ e per l'enterotossina (Bueschel D.M. et al., 2000; Rosignoli et al., 2004). Il test è stato effettuato presso la Sezione di Mantova dell'IZSLER.

Esame citologico
I preparati citologici, allestiti tramite impronta di una sezione epatica, sono stati essiccati all'aria e colorati tramite l'impiego di una colorazione rapida presente in commercio (Diff Quick).

Esame istologico
Campioni di fegato, milza, rene, polmone, cuore, encefalo e porzioni di diversi tratti intestinali sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati al microtomo a 5 μm di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo le metodiche in uso. Sezioni seriali dei tratti intestinali sono state inoltre colorate con la colorazione di Gram.

Esame tossicologico
In seguito alla valutazioni dei quadri anatomopatologici sono stati eseguiti prelievi di mangime gestazione per scrofe al fine di valutare la presenza di micotossine, in particolare sono state ricercate lo zearalenone, mediante metodica micro-LCMS, le aflatossine B1, B2, G1 e G2 e l'ocratossina A, mediante cromatografia liquida (HPLC) e le fumonisine B1 e B2 tramite cromatografia liquida spettrometrica di massa (LCMS/MS).

Interventi profilattici/terapeutici
In attesa dell'esito delle indagini descritte precedentemente, considerata la gravità della situazione sanitaria, si è intervenuti farmacologicamente con l'impiego di un protocollo

terapeutico ad ampio spettro, impiegando chinolonici somministrati per via parenterale ed associazioni di penicilline e polimixine per via orale. Successivamente all'inquadramento eziologico del problema sanitario si è invece intervenuti con l'impiego di Tilosina "long acting", somministrata per via parenterale impiegando la dose di 20 mg/kg di peso corporeo.

Analisi statistica
Le differenze osservate nel numero di soggetti deperiti e nel numero di soggetti con diarrea in lattazione rispetto ai nati totali tra i differenti mesi di produzione, sono state confrontate tramite test Chi^2 con livello di significatività $p<0.01$.

RISULTATI

Allevamento e rilievi clinici
A partire dal mese di dicembre nelle sale parto si è verificato un aumento della mortalità nei suinetti (tabella 2), i quali già nelle prime 24 ore dal parto, presentavano apatia ed ittero, si coricavano sotto la lampada in posizione antalgica e si avvicinavano al capezzolo con fatica. Nel nido era possibile riscontrare la presenza di feci diarroiche trasparenti e gelatinose alla palpazione. La morte sopraggiungeva nell'arco delle 12 ore successive alla comparsa dei sintomi. Durante questa prima fase la morbilità era attorno al 20%, mentre la mortalità raggiungeva valori prossimi al 100%.
Con il passare dei giorni, nei soggetti sopravvissuti, piuttosto che in alcune covate non ancora colpite, faceva la comparsa una diarrea emorragica, picea, dall'odore sgradevole e dalla consistenza collosa. Anche in questo caso la mortalità era molto elevata, mentre la morbilità si presentava attorno al 5%.
Nella tabella 2 sono riportati, in ordine cronologico, gli eventi relativi alla sala parto nel periodo che va da ottobre 2008 a marzo 2009.

Tabella 2: dati aziendali delle sale parto
Table 2: management data of farrowing room

Periodo parto	N parti	NT	Morti nelle 24h	Morti in lattaz.
Totale Ottob.	91	1205	40sc, 23sp, 24altro	42sc, 20de[a],2em, 0dr[a]
Totale Novem.	89	1134	36sc, 23sp, 30altro	25sc, 7de[a], 3em, 0dr[a]
Totale Dicem.	103	1276	30sc, 43sp, 28altro	25sc, 89de[b], 0em, 2dr[a]
Totale Gennaio	134	1795	67sc, 78sp,19 altro	29sc,26de[a], 0em, 66dr[b]
Totale Febb.	97	1305	46sc, 64sp, 9altro	6sc, 13de[a], 0em,13dr[c]
Totale Marzo	92	1144	47sc, 20sp, 28altro	8sc, 14de[a], 0em, 4dr[a]

Legenda:
NT: nati
Sc: schiacciati
Sp: sottopeso
De: deperiti
Dr: diarrea
Em: emorragia
[a,b,c]= a lettera differente corrisponde differenza statisticamente significativa (test chi^2, $p<0.01$) del numero di De/Dr rispettivamente al numero di NT nei differenti mesi.

Necroscopia
L'esame necroscopico eseguito sulla scrofa deceduta ha evidenziato quadri di epatomegalia e diminuzione di consistenza del parenchima epatico che si presentava inoltre di colore giallastro. A livello di intestino tenue si sono rilevati quadri di enterite catarral-emorragica.
Nei suinetti sottoscrofa sono stati osservati quadri anatomo-patologici differenti da mettere in relazione al momento della morte dell'animale rispetto all'evoluzione del processo patologico in atto. I quadri anatomo-patologici osservati nei 6 suinetti conferiti e deceduti con le forme acute descritte in precedenza (morte entro 12 ore dalla comparsa dei sintomi) erano caratterizzati da epatomegalia e colorazione giallastra del parenchima epatico che presentava inoltre diminuzione della consistenza e piccole aree di necrosi di alcuni mm di diametro. In due soggetti era inoltre evidente la rottura del fegato con abbondante emoperitoneo.
Nei conferimenti successivi, costituiti complessivamente da 8 suinetti, coincidenti con una riduzione della mortalità e con la comparsa di una diarrea emorragica nei soggetti colpiti, erano evidenti quadri anatomo-patologici intestinali caratterizzati da edema mesenterico ed intensa iperemia della mucosa intestinale, soprattutto a livello di digiuno e ileo, ascrivibili ad enterite emorragica (foto 1). A livello degli altri organi ed apparati, sia della cavità addominale che toracica, non sono state evidenziate lesioni degne di nota, eccezion fatta per quadri di congestione polmonare in alcuni animali.

Esame batteriologico
L'esame batteriologico dal contenuto intestinale sia della scrofa sia dei suinetti ha permesso di isolare in anaerobiosi un batterio emolitico, Gram positivo, bastoncellare, identificato come *Clostridium perfringens*. La determinazione quantitativa del batterio è risultata essere altamente significativa (1×10^7 ufc/g nei suinetti, e 12×10^7 ufc/g nella scrofa).
Gli esami batteriologici eseguiti su fegato, rene e milza hanno sempre dato esito negativo.
La ricerca di *Clostridium difficile* dal contenuto intestinale e delle relative tossine tramite test ELISA hanno dato in tutti casi esiti non significativi.

Genotipizzazione
La successiva genotipizzazione tramite PCR ha identificato l'agente eziologico come portatore dei geni codificanti le tossine α e $\beta 2$.

Esame citologico
L'esame citologico su impronte di parenchima epatico evidenziava quadri degenerativi a carico degli epatociti.

Esame istologico
Istologicamente le lesioni più significative erano localizzate nei tratti intestinali che mostravano intenso edema dell'asse dei villi e della sottomucosa, vasi ectasici e coagulazione intravasale disseminata (foto 2). I villi erano iperemici, necrotici ed in alcuni tratti il materiale necrotico, costituito per la maggior parte da detriti cellulari, fibrina e granulociti neutrofili, si depositava sulla loro superficie formando delle pseudomembrane. Ammassi batterici Gram positivi con spore terminali erano frammisti al detrito cellulare. L'edema era presente anche nel linfonodo meseraico associato ad ectasia dei vasi linfatici, deplezione linfocitaria, necrosi multifocali e microascessi nella

midollare. Il fegato mostrava degenerazione torbido-vacuolare degli epatociti, necrobiosi e stasi biliare. Nel rene i tubuli uriniferi erano ectasici con epitelio di rivestimento appiattito e nel lume erano presenti ammassi di cellule desquamate, detriti necrotici e più raramente cellule infiammatorie. Nell'encefalo, cuore, polmone e nella milza non si apprezzavano reperti di rilievo.

Esame tossicologico
Gli esami tossicologici eseguiti sul mangime per la ricerca delle micotossine (zearalenone, aflatossine B1, B2, G1 e G2, fumonisine B1 e B2 e ocratossina A) hanno evidenziato valori compresi nei limiti disposti dalle norme legislative.

Interventi profilattici e terapeutici
Gli interventi farmacologici messi in atto alla comparsa dei sintomi hanno sempre sortito risultati decisamente scadenti. In concomitanza all'isolamento di *Clostridium perfrigens* ci si è orientati verso una strategia terapeutica caratterizzata dall'impiego di un'associazione parenterale sulfamidici-macrolidi, somministrati, per l'appunto, prima della comparsa dei sintomi a tutti i suinetti. Da questo punto in avanti si sono cominciati ad apprezzare i primi risultati. Infine, grazie ad un macrolide "*long acting",* sempre somministrato per via parenterale e rigorosamente entro le prime 12 ore di vita, si è assistito ad un completo controllo dell'insorgenza dei sintomi, come evidenziato nei mesi di febbraio e marzo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La sintomatologia evidenziata è stata caratterizzata da diverse fasi. In un primo momento si è assistito a morte improvvisa dei suinetti entro poche ore dalla nascita e con presenza di lesioni anatomopatologiche scarsamente significative all'esame necroscopico. Successivamente vi è stata una riduzione della mortalità e nei sopravvissuti compariva una sintomatologia più evidente, caratterizzata da diarrea necrotico-emorragica. L'esame necroscopico ha evidenziato quadri di enterite emorragica al piccolo intestino compatibile con un'infezione da *C. perfrigens*.
A conferma del quadro clinico ed anatomo-patologico, l'esame microbiologico ha evidenziato la presenza di un numero significativamente elevato di *Clostridium perfringens* tipo A + β2 a livello intestinale e l'esame istologico ha rilevato quadri altamente significativi e compatibili con una diagnosi di enterotossiemia da clostridi.
Le indagini in PCR spese a verificare la presenza di eventuali altri agenti eziologici, come il virus della malattia di Aujeszky e l'encefalomiocardiovirus (EMCV), le indagini parassitologiche (che per semplicità non sono state riportate per esteso nel lavoro), così come gli esami tossicologici per la ricerca di micotossine, hanno dato tutte esito negativo.
La terapia messa in atto a scopo preventivo tramite somministrazione parenterale di un antibiotico specificatamente attivo nei confronti dei clostridi ha dato ottimi risultati.
Alla luce dei fatti qui riportati si può concludere che l'allevamento in questione, con buone probabilità, è stato interessato da una forma clinica ascrivibile ad enterotossiemia da *Clostridium perfringens* tipo A + β2 che si è completamente risolta grazie ad un trattamento antibiotico preventivo mirato, al mantenimento di elevati standard igienici nelle sale parto e all'applicazione di pratiche in grado di favorire un buon trasferimento dell'immunità materna nel suinetto lattante.

FOTO 1: Suinetto di 2 giorni d'età. Quadri anatomopatologici compatibili con degenerazione epatica ed enterite emorragica con prevalente localizzazione al piccolo intestino.
FIGURE 1: Two days old piglet. Liver degeneration and haemorrhagic small intestine.

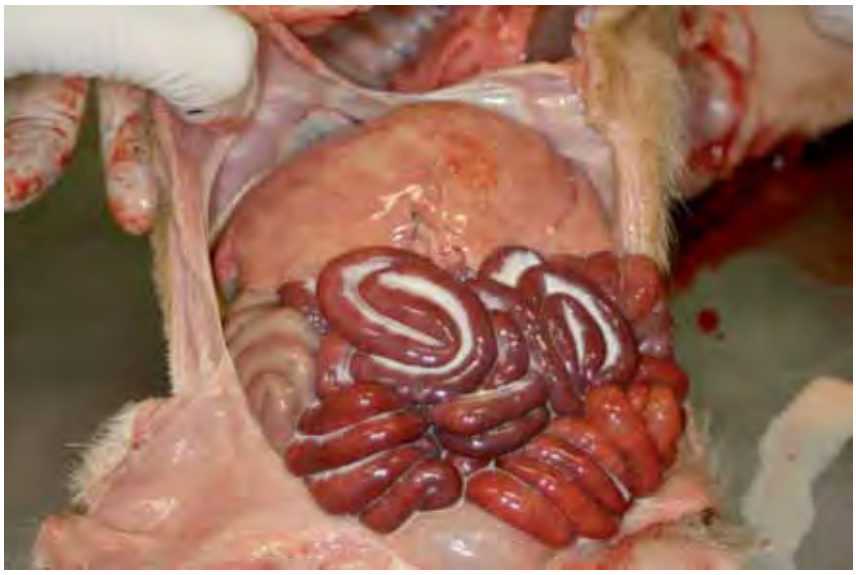
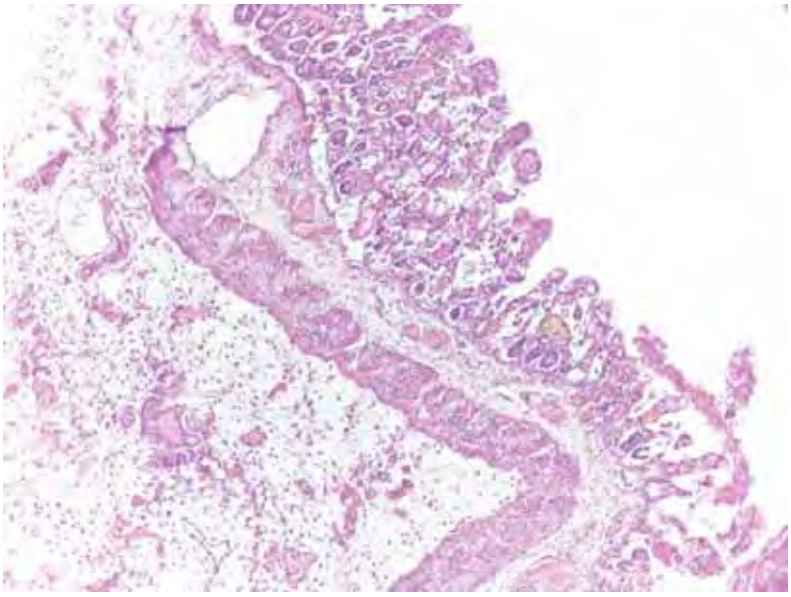


FOTO 2: Piccolo intestino. Intenso edema a livello della sottomucosa, lamina propria e villi, congestione dei vasi ematici e necrosi dei villi (20x, ematossilina-eosina)
FIGURE 2: Small intestine. Necrosis of the mucosa, blood vessels congestion snd edema localized in the submucosa and villus.



BIBLIOGRAFIA

1. Bryant A.E., Bayer C.R., Aldape M.J., Wallace R.J., Titball R.W. and Stevens D.L. (2006). "*Clostridium perfringens* phospholipase C-induced platelet/leukocyte interactions impede neutrophil diapedesis". J. of Med. Microbiol. 55: 495-504.
2. Bueschel D.M., Songer J.G., Garmory H.S., Chanter N., French N.P., and Titball R.W. (2000). "Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assay". Epidemiol. Infect. 124: 61-67.
3. Hansen M.V. and Elliot L.P. (1980). "New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test". J. of Clinical Microbiology, 617-619.
4. Le Guennec J., Moalic P.Y., Salle E., and Manteca C. (2003). "Are clostridia a major etiology of diarrhoea in piglets?" In: Clostridial Enterotoxaemia and Enteritis in Farm Animals, pp. 61-62.
5. Nardi M., Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2005). "Il *Clostridium difficile* nelle enteriti neonatali del suinetto: indagine in allevamenti della pianura padana". Atti XXXI Meeting annuale Sipas, pp. 531-538.
6. Nardi M., Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A.D. (2005). "Il Costridium difficile nelle enteriti neonatali del suinetto: indagine in allevamenti della Pianura Padana". Atti del Congresso della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini – Mantova – pp. 531-538.
7. Nigrelli A.D. (2009). "Enteriti neonatali enzootiche dei suinetti lattanti, con particolare riguardo alle clostridiosi". Atti XXXV Meeting annuale Sipas, pp. 134-141.
8. Okazaki Y., Inage M., Iwabuchi I., Suzuki T., Okada N., Watanabe K. and Yamamoto T. (1993). "Mass outbreak of necrotic enteritis in newborn piglets caused by *Clostridium perfringens* type C on a pig farm". J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 46: 214-217.
9. Rosignoli C., Faccini S., Franzini G., Costa A., Nardi M., Nigrelli A.D. (2004). "Rilevamento in ceppi di Clostridium perfringens dei geni codificanti per le tossine letali maggiori, la tossina beta 2 e l'enterotossina mediante multiplex PCR". VI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Abano Terme 10-12 Novembre 2004, pp 205-206.
10. Sanz M.G., Venturini L., Assis R., Uzal F.A. (2005). "Fibrinonecrotic enteritis of piglets in a commercial farm. A post-mortem study of the prevalence and the role of lesion associated agents *Isospora suis* and *Clostridium perfringens"*. J. Vet. Med. Sci.
11. Songer J.G. (1996). "Clostridial enteric disease of domestic animals". Clinical Microbiology Reviews, 9: 216-234.
12. Songer J.G., Glock R.D., Post K.W., (2004): Clostridial diarrheal diseases: neonatal infections that affect postweaning performance. American Ass. Swine Veterin., pp. 491-494
13. Songer J.G. and Uzal F.A. (2005). "Clostridial enteric infections in pigs". J. Vet. Diagn. Invest. 17: 528-536.
14. Tayler D.J. (2003). "Clostridia and clinical disease in pigs". In Clostridial Enterotoxaemia and Enteritis in Farm Animals, pp. 51-60.
15. Taylor D.J. et Bergeland M.E. (1996). "Infezioni da clostridiosi". Malattie del suino pp. 547-564.

DESCRIZIONE DI UN EPISODIO DI INFLUENZA DA VIRUS PANDEMICO (A/H1N1) IN UN ALLEVAMENTO SUINO DEL NORD ITALIA

PANDEMIC INFLUENZA VIRUS (A/ H1N1) OUTBREAK IN PIG FARM IN NORTH OF ITALY

ZANONI MG, GRADASSI M., MORENO MARTIN A., CATELLI A. , SALOGNI C., SOZZI E.,FONI E.,CORDIOLI P., ALBORALI L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Suino, Influenza, H1N1, virus pandemico
Key words: Pigs, Influenza, H1N1, pandemic virus

RIASSUNTO

Il virus dell'influenza suina (*SIV*) è causa di patologia respiratoria acuta ed è un importante patogeno che concorre all'eziologia del complesso respiratorio del suino (PRDC). Questo lavoro descrive il primo episodio di infezione da virus influenzale tipo A H1N1 ceppo pandemico in un allevamento di riproduttori. Le manifestazioni cliniche erano grave prostrazione ed agalassia soprattutto in scrofe che avevano partorito da 3-7 giorni. Le nidiate si presentavano disomogenee e i suinetti apparivano dimagriti e disidratati. Il danno che ha coinvolto anche le intere nidiate delle scrofe colpite è stato quantificato in un aumento delle perdite in sala parto e un a riduzione delle performance delle scrofe in termini di aumento di mortalità e riduzione della fertilità.

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 first H1N1 pandemic outbreak in sow farm in Italy is described in this paper. The main clinical signs were depression and agalactia in sows during the first week after farrowing. Different weights were observed in litters and piglets showed wasting and dehydration. The loss interested litters and were quantified in increased mortality in farrowing units, performance reduction in sows consisting in enhanced mortality and fertility rate reduction.

INTRODUZIONE

I virus influenzali di tipo A, membri della famiglia Orthomyxoviridae, sono 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"). In Italia l'infezione da virus influenzale interessa prevalentemente la categoria produttiva dello svezzamento ed il sistema di allevamento da riproduzione a ciclo aperto.

La significativa presenza di vari agenti patogeni della patologia respiratoria SIV-associata, avvalora l'ipotesi che il virus dell'influenza suina possa ricoprire un ruolo protagonista nell'evoluzione della sindrome PRDC.In episodi di patologia respiratoria il virus influenzale è risultato essere associato a PRRSV nel 65, 3%, ad agenti batterici nel 58,7%,a PCV2 nel 34% ed a *M. hyopneumoniae* nel 9,3 % (Gradassi et al., 2009) 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). Nel 2009 si è verificata una pandemia influenzale sostenuta da un ceppo A (H1N1) che contiene geni di derivazione suina, aviare e umana e che ha interessato inizialmente il Centro-Nord America coinvolgendo successivamente altri continenti. Il nuovo virus pandemico è in grado di infettare il suino sia in condizioni sperimentali che di campo come evidenziato in Canada,Argentina,Australia e successivamente anche in Europa causando una sindrome respiratoria lieve (Hofshagen et al 2009; OIE, 2009)
Il nuovo virus ha caratteristiche antigeniche e genetiche che lo distingue dai ceppi H1N1 circolanti in Europa e in Italia. L 'infezione da virus influenzali è presente dal 1976 in Italia e attualmente la maggior parte degli allevamenti suini risulta coinvolta. Tre sono i sierotipi presenti negli allevamenti nazionali: H1N1, H3N2, H1N2, frutto di riassortimenti complessi e ancora da chiarire nei loro dettagli, ma sicuramente avvenuti nel suino, probabilmente tra virus umani, aviari e suini (Barigazzi et al.2003; Luppi et al,2007; Moreno Martin et al.2008). L'influenza suina si manifesta con forme cliniche evidenti ma più spesso con forme asintomatiche responsabili di danni zootecnici ad oggi difficilmente quantificabili. 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.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) (Thacker et al., 2001 ; Van Reeth *et al*., 1996; Ellis *et al*., 2004; Mancini *et al*., 2005; Wang e Lu., 2008). Scopo di questo lavoro è di descrivere un episodio di influenza suina che ha interessato i riproduttori e i suinetti in sala arto, verificato nel 2009 in un allevamento del nord Italia con particolare riguardo agli aspetti zootecnici ed ai reperti che hanno permesso la diagnosi definitiva con l'isolamento per la prima volta di H1N1 pandemico nel suino in Italia

MATERIALI E METODI

Sintomatologia e dati produttivi

L'episodio si è verificato in un allevamento del nord Italia di 1264 scrofe di razza pura in produzione a rimonta esterna che prevedeva lo spostamento di suinetti di 6-10 Kg in

svezzamenti esterni. Nel novembre 2009 è comparsa una sintomatologia che coinvolgeva soprattutto le sale parto caratterizzata da una forma enterica nei suinetti di 5-10 giorni di vita con diarrea e bassa mortalità e da abbattimento ed ipertermia nelle scrofe.
Dopo la raccolta di un'anamnesi remota e recente è stata eseguita in diversi sopralluoghi una accurata indagine clinica che ha consentito di seguire settimanalmente l'evoluzione della situazione. Al fine di valutare l'impatto della malattia sulla produttività aziendale sono stati raccolti ed elaborati i dati zootecnici riferiti ai mesi di novembre, dicembre 2009 e gennaio 2010 in cui vi è stata sintomatologia e confrontati a quelli relativi allo stesso periodo del 2008/09.

Prelievo campioni
In due momenti diversi sono stati consegnati in laboratorio 9 suinetti sottoscrofa deceduti in allevamento ed appartenenti a differenti nidiate problema.
Nelle sale parto interessate sono state selezionate 4 scrofe con sintomatologia ed ipertermia e sottoposte a prelievo di campione di sangue e tamponi nasali.
Inoltre sono stati prelevati campioni di sangue da scrofe in diverse fasi di gravidanza e poste in unità produttive differenti e da suinetti di età diverse. Alcune scrofe sono state controllate a distanza di 28 giorni per valutare la siero conversione.

Indagini di laboratorio
I suinetti sono stati sottoposti ad esame anatomo patologico e sono stati prelevati organi quali polmone, fegato, milza, rene, ed intestino ed utilizzati per esame batteriologico al fine di procedere all'isolamento dei principali patogeni batterici respiratori ed enterici. Inoltre sono stati testai per la ricerca di PRRSV, PCV2 *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante RT-PCR, multiplex PCR e PCR rispettivamente (Calsamiglia et al, 1999; Quadrani et al , 1999; Suarez et al 1994). In particolare sono stati preparati omogenati dei polmoni dei suinetti e riuniti in due pool di 4 animali ciascuno e il soggetto con evidenti lesioni polmonari è stato esaminato in singolo.
I tamponi nasali sono stati sottoposti a screening per la ricerca di virus influenzale A mediante RT-PCR (5). I campioni positivi successivamente sono stati testati per la ricerca
Tutti i campioni sono stati sottoposti a screening tramite tecnica Real Time RT-PCR gene-matrice per la ricerca del genoma virale di influenza virus tipo A (Spackman et al., 2002).
A partire dalle matrici risultate positive a tale esame si è proceduto alla ricerca di H1N1pandemico mediante RT-PCR (rt RT-PCR), in accordo con le procedure CDC (CDC,2009) e all'isolamento virale con le metodiche finalizzate, che prevedono l'inoculazione del campione in uova embrionate e colture cellulari (Gradassi et al. 2009)
L'isolamento e l'identificazione di ceppi batterici responsabili di setticemia e-o polmonite è stato possibile per mezzo delle procedure di routine di coltura batterica e tipizzazione.
L'esame sierologico è stato eseguito mediante test immunoenzimatico di tipo ELISA e test di Inibizione dell' Emoagglutinazione (HI). Per l'identificazione degli anticorpi nei confronti della nucleoproteina di tipo A (NPA), è stato impiegato un test immunoenzimatico di tipo ELISA competitiva, utilizzando un anticorpo monoclonale (Mab) anti-NPA ATCC HB65 (De Boer al.,1990) e il virus parzialmente purificato adsorbito alla piastra. I sieri sono stati esaminati diluiti 1/10 e 1/20. La ricerca di anticorpi sottotipo-specifici è stata eseguita tramite test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando gli antigeni suini sottotipo H1N1, H3N2, H1N2, H1N1 pandemico e l'antigene umano H1N1 pandemico, secondo metodica standardizzata (Kendall et al.1982; OIE 2008).

RISULTATI

Sintomatologia e dati produttivi

Nei dati raccolti dall'allevatore per costruire una precisa anamnesi remota e recente spiccava il riferimento ad una sindrome enterica "anomala" con scarsa risposta ai normali trattamenti antibiotici associata ad una anoressia delle scrofe. Nel corso del sopralluogo è stata messa in evidenza sintomatologia che interessava la nidiata sia a carico dei suinetti che delle scrofe. In particolare erano interessate le sale parto con parti più recenti dove i suinetti avevano dai 3-15 giorni di vita. La sintomatologia interessava il 30-50 % delle scrofe che , pur con gravità diversa, presentava un comportamento anomalo soprattutto nei confronti della nidiata. Nelle sale parto con suinetti prossimi allo svezzamento non era presente sintomatologia e l'aspetto dei suinetti e delle scrofe era pressoché normale.

Le manifestazioni cliniche più evidenti nelle scrofe erano rappresentate da grave prostrazione, agalassia, animali in stazione o in decubito sternale con dispnea-polipnea, alcuni con respiro a bocca aperta e spesso con anoressia confermata dalla presenza di abbondante alimento nella mangiatoia. Inoltre erano presenti scoli vaginali biancastri soprattutto nelle scrofe che avevano partorito da 3-7 giorni. Si constatava ipertermia (39,5-40,5°C) in alcune delle scrofe con sintomatologia senza per altro che vi fossero alterazioni della consistenza delle feci. Gli animali ammalati presentavano uno stato di nutrizione scadente a partire dalla seconda settimana dal parto fino ad apparire emaciati nelle fasi finali della lattazione. Le nidiate si presentavano disomogenee e molti suinetti stavano raggruppati a mutuo contatto, addossati alla scrofa e spesso erano visibili animali dimagriti e disidratati. La mortalità totale dei suinetti durante la lattazione era aumentata fino a toccare il 20 % per 3 settimane.

Di seguito vengono riportati i grafici dei valori dei principali parametri produttivi riferiti al trimestre (novembre dicembre e gennaio) del 2008/09 e 2009/10. Inoltre sono evidenziati i dati medi annuali 2008 e 2009 dell'azienda.

Figura 1 . Numero nati totali, numero nati vivi e numero svezzati 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10

Figure 1 *. Total born, born alive and weaned piglets in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10*

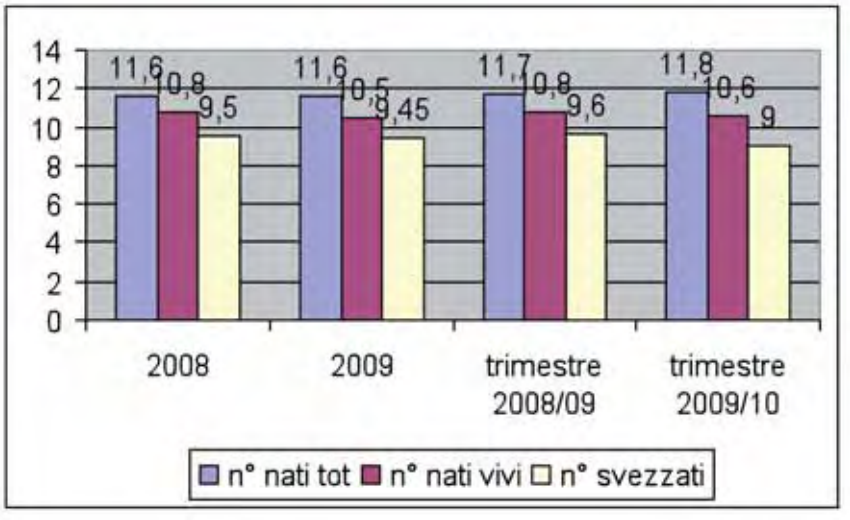


Figura 2. % di scrofe riformate e fertilità nel 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10
Figure 2. *%.replacement. and fertility in sows in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10*

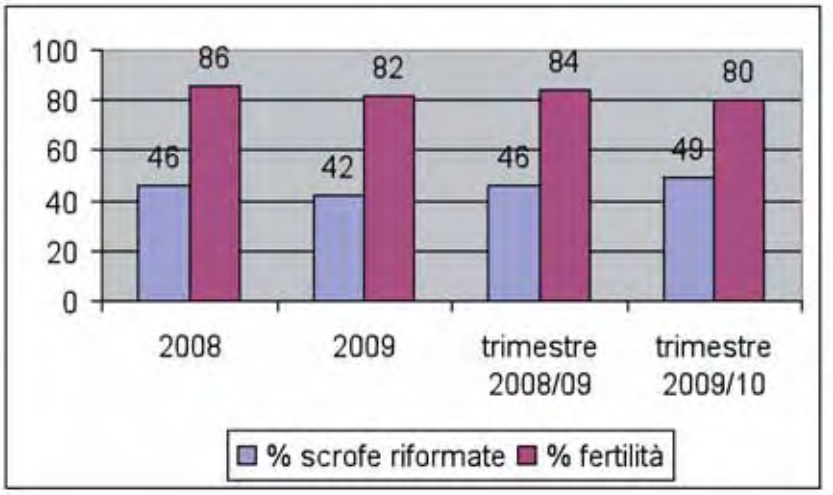
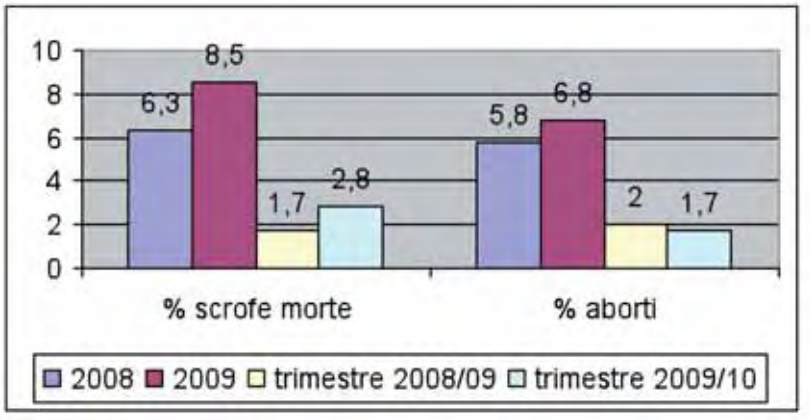


Figura 3 . % di mortalità delle scrofe e di aborti nel 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10
Figura 3 *. % sow mortality and abortions in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10*



Esami di laboratorio
L'esame anatomo-patologico ha evidenziato in 8 soggetti enterite catarrale mentre il n 9 presentava una polmonite lobulare con aree di epatizzazione localizzati soprattutto ai lobi apicali.
I polmoni dei suinetti 1-4 appartenenti al pool n 1 e il polmone del suinetto con lesioni polmonari sono risultati positivi per virus influenzale tipo A H1N1 ceppo pandemico. PRRSV ceppo Europeo è stato evidenziato nel pool 1 mentre il pool 2 e il soggetto 9 sono risultati negativi.

Le indagini per ricerca PCV2, *M.hyopneumoniae* e patogeni batterici sono risultate negative. I sieri prelevati in fase acuta non presentavano titoli anticorpali nei confronti dei classici sottotipi influenzali del suino. I campioni prelevati dopo 28 giorni dalla dimostrazione del virus presentavano un risultato positivo all'Elisa NpA e avevano titoli variabili da 1/20 a 1/160 in HI nei confronti del virus pandemico.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le infezioni da SIV si manifestano sotto forma di focolai caratterizzati da un quadro respiratorio acuto, a insorgenza ed evoluzione rapida, e spesso con forme asintomatiche responsabili di danni zootecnici ad oggi difficilmente quantificabili.

Nell'episodio descritto l'infezione da virus influenzale ha interessato soprattutto le scrofe durante le prime fasi della lattazione causando letargia anoressia e agalassia con conseguente danno all'intera nidiata. Il peggioramento delle performance delle scrofe e dei suinetti unitamente all'aumento dei costi sostenuti per i trattamenti hanno portato a danni economici importanti. La valutazione dei parametri produttivi paragonati ai valori degli stessi tre mesi dell'anno precedente hanno permesso di quantificare i danni zootecnici del periodo problema soprattutto in un aumento delle perdite medie in sala parto (0,6 suinetti in meno) , delle scrofe perse o per riforma (+ 3 ,5 %) o per la mortalità (48 scrofe morte nel trimestre 2008/09 rispetto alle 29 nel trimestre 2009 /10) e una riduzione della fertilità (- 4%) per l'aumento dei ritorni.

Nelle indagini viologiche precedenti negli allevamenti del Nord Italia ad oggi sono stati dimostrati tre sottotipi virali H1N1, H3N2 e H1N2, in ordine di prevalenza (Luppi et al., 2007; Barigazzi e Donatelli, 2003).

Questo lavoro riporta il primo isolamento con caratterizzazione genomica di H1N1v in un allevamento suino italiano. La sequenziazione e l'analisi filogenetica di A/Sw/It/290271/09 conferma una elevate similitudine del genome del ceppo isolato nell'episodio descritto al H1N1 pandemico. Le indagini virologiche effettuate mediante il prelievo di tamponi nasali non hanno consentito di dimostrare la presenza di virus influenzale nel personale dell'allevamento al momento della diagnosi nei suini. Pur non potendo escludere altre vie di infezione , l'ipotesi della trasmissione a partire da personale affetto da influenza nelle settimane precedenti rimane una delle più probabili. Il programma di monitoraggio per l'influenza suina eseguito dall'IZSLER da molti anni ha permesso di caratterizzare i ceppi di virus influenzali circolanti negli allevamenti della Pianura Padana e di individuare la circolazione di H1N1 pandemico nel novembre 2009. La continuazione e l'implementazione delle indagini nelle forme respiratorie dl suine permetterà di verificare nel tempo la diffusione del virus pandemico negli allevamenti.

L'isolamento di PRRSV in un pool di polmoni di suinetti in assenza di sintomatologia riproduttiva nelle scrofe conferma il fatto che il l'associazione del virus influenzale sia un evento frequente negli ultimi anni nei suinetti in svezzamento negli allevamenti italiani (Gradassi et al.,2009)

BIBLIOGRAFIA:

1. Barigazzi G., Donatelli I. (2003): Swine influenza in Italy. Veterinary Research Communication, 27: 93-99.
2. 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; 11: 246-251.
3. Centers for Disease Control and Prevention, CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1), rev 2 (6 October 2009). Available from http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html
4. De Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "An ELISA for detection of antibodies

against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species". Arch. Virol. 115, 47-61

5. 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.
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.
6. Gradassi M., Sozzi E., Zanoni M., Salogni C., Cordioli P., Alborali L.(2009) Il virus influenzale suino (SIV) e le principali associazioni virali, batteriche e da Mycoplasma – Hyopneumoniae in 150 episodi di patologia respiratoria nel suino Atti SIPAS 2009 - XXXV :229-241.
7. Hofshagen M, Gjerset CEr, Tarpai A, Brun E, Dannevig B, Bruheim T et al. Pandemic influenza A (H1N1) v: human to pig transmission in Norway?. Euro Surveill. 2009; 14(45):pii 19406.
8. Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) "Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance". Atlanta, U.S. Department of Health and Human service.
9. 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.
10. Moreno Martin A, Barbieri I, Chiapponi C, Foni E, Sozzi E, Canelli E, Luppi A, Cordioli P.. Genetic characterization of H1N1 and H1N2 swine influenza viruses isolated in Italy in 1998-2007... Second annual meeting EPIZONE (Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control) "Need for Speed", 4-6 June 2008, Brescia (Italy), 2008a, abstract p99. Available from http: www.epizone.net.
11. OIE World Animal Health Information Database: follow up report [online database]. Influenza A H1N1, Canada: report n.1, 11-6-09, Argentina: report n.1, 01-07-09, England: report n.1, 25.09.09, Norway: report n.1, 13-10-09, China: report n.1, 13-11-09. Available from http://www.oie.int/wahis
12. Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea, S. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 3917-3924. .
13. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL.. 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 2002; 40(9):3256-60.
14. Suárez P., Zardoya R, Prieto C, Solana A, Tabarés E,. Bautista JM, Castro JM. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). Arch Virol 1994;135: 89-99.
15. Thacker E.L., Thacker B.J., Janke B.H. (2001): Interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and swine influenza virus. J. Clin. Microbiol., 39: 2525-2530.
16. 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.
17. Van Reeth K. (2007): Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. Vet. Res., 38: 243-260.
18. 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.
19. Word Organisation for Animal Health (OIE) (2008). – Swine Influenza, Chapter 2.8.8. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed. OIE, Paris.

VACCINO ASSOCIATO CONTRO LA PARVOVIROSI E IL MALROSSO DEI SUINI

EFFICACIA
VACCINI MERIAL PER SCROFE E SCROFETTE
SICUREZZA

VACCINO ASSOCIATO MERIAL CONTRO LA PARVOVIROSI E IL MALROSSO DEI SUINI

L'efficacia della duplice immunità brilla di luce propria!

- Il vaccino Merial induce una duplice risposta immunitaria*, cellulo-mediata e umorale, fornendo così una protezione ampia e a lungo termine.
- Con il vaccino Merial, avrete la sicurezza di proteggere scrofe e scrofette grazie alla sua insuperabile esperienza.
- Più di 45 milioni di dosi vendute in tutta Europa!

* IPVS 2006. Abstracts 951, 991, 1007.

Fate come chi se ne intende...
chiedete al vostro Medico Veterinario!

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 2009. Tutti i diritti riservati.

MERIAL

VIRUS INFLUENZALE PANDEMICO (A/H1N1) NEL SUINO

PANDEMIC INFLUENZA VIRUS (A/H1N1) IN PIGS

SOZZI, E., MARTINELLI, N., MORENO, A., LELLI, D., FONTANA, R., CANELLI, E., VINCO, L.J., ALBORALI, G.L., LOMBARDI, G., CORDIOLI, P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Brescia

Parole chiave: influenza virus pandemico, infezione sperimentale, suino
Key words: pandemic influenza virus, experimental infection, pigs

RIASSUNTO Il virus influenzale pandemico A/H1N1 è un nuovo ceppo di virus influenzale tipo A/H1N1 di origine suina caratterizzato dalla combinazione di segmenti genomici di lineaggio Nord Americano ed Europeo e responsabile di infezioni respiratorie nell'uomo. Per meglio comprendere la dinamica di replicazione, la trasmissione virale e l'insorgenza di sintomi clinici nei suini, sono state condotte infezioni sperimentali con virus pandemici A/H1N1. Nella prima infezione sperimentale, sono stati infettati due suini con A/It/148/2009 (H1N1), che hanno manifestato sintomi respiratori, caratterizzati da scolo nasale, tosse e rialzo termico per 3 giorni post infezione (p.i.). Il virus è stato isolato dal suino sacrificato 3 giorni p.i., mentre nell'altro suino è stata rilevata la comparsa di una risposta immunitaria specifica. Nella seconda infezione sperimentale, sono stati infettati cinque suini con A/Sw/It/290271/2009 (H1N1) e due soggetti sono stati posti a contatto.. I tamponi nasali di tutti i soggetti infettati, prelevati da 2 a 7 giorni p.i., sono risultati positivi in rRT-PCR, mentre solo due al 9 giorno p.i. La risposta anticorpale è stata rilevata tramite NPA-ELISA e HI da 9 giorni p.i. e da 14 giorni p.i., rispettivamente per i suini infettati e per quelli a contatto.

ABSTRACT Influenza virus A/H1N1, which is currently causing a pandemic, contains gene segments with ancestors in the North American and Eurasian swine lineages. To get insights into virus replication dynamics, clinical symptoms and virus transmission in pigs, we infected animals intratracheally with influenza pandemic viruses A/H1N1. In the first trial, nasal discharge, sneezing and fever were observed in two pigs inoculated with A/It/148/2009 (H1N1).. One pig was sacrificed 3 days post-infection (p.i.) and virus detected in lungs, trachea and nasal swabs. Serum of other infected pig collected 18 days p.i. was positive by NPA-ELISA and HI tests. In the second trial, pigs inoculated with A/Sw/It/290271/2009 (H1N1) developed only mild fever. Nasal swabs of all infected animals were positive by rRT-PCR 2, 4 and 7 days p.i., and 9 days p.i. in only two pigs. Contact pigs became infected, shed virus and developed clinical symptoms similar to those shown by the inoculated animals. Serological response was evidenced by NPA-ELISA and HI starting 9 days p.i. in infected and 14 days p.i. in contact pigs.

INTRODUZIONE

Il virus influenzale A/H1N1 è stato isolato per la prima volta nel suino nel 1930 (7).. I virus appartenenti a questo sottotipo, denominati "classical swine", hanno circolato nella popolazione suina in Europa rimanendo relativamente stabili tra il 1930 e la fine degli anni '70. Negli anni successivi, quando sono stati osservati significativi drift antigenici dei virus influenzali H1 nell'uomo, si è creato un sostanziale gap antigenico tra i virus "classical swine" e quelli H1 umani stagionali, creando le condizioni ottimali per il suino di fungere da

reservoir di virus influenzali H1, con possibilità di causare malattia respiratoria acuta o anche pandemie nell'uomo (4).
Nell'ultima decade sono state ampiamente documentate (2, 6, 9, 10) infezioni naturali nell'uomo con virus influenzali suini, che hanno determinato la comparsa di infezioni transitorie ed occasionalmente fatali, ma senza acquisire la capacità di diffondere in modo efficace intraspecie.
Nell'aprile 2009 è stato identificato un nuovo ceppo di virus influenzale tipo A/H1N1 di origine suina caratterizzato dalla combinazione di segmenti genomici di lineaggio Nord Americano ed Europeo e responsabile di infezioni respiratorie nell'uomo. Il nuovo virus influenzale A/H1N1 ha mostrato la capacità di trasmettersi nella popolazione umana in tutto il mondo, venendo così definito virus influenzale A/H1N1 pandemico (3).
Dalla conferma del primo caso di trasmissione del virus A/H1N1 pandemico dall'uomo al suino in Canada notificato dalla OIE, la World Health Organization (WHO) ha raccomandato misure di sorveglianza e controllo per il nuovo virus influenzale A/H1N1 nei suini, considerato il ben noto ruolo del suino come un "mixing vessels". Da allora si sono susseguite diverse segnalazioni di focolai di influenza da virus pandemico nel suino in diverse parti del mondo.
In Italia questo virus è stato identificato per la prima volta a novembre in un allevamento suinicolo a ciclo aperto della Pianura Padana: le scrofe colpite hanno manifestato una sintomatologia caratterizzata da diminuzione dell'appetito, agalassia, debolezza e febbre, che si è risolta completamente in pochi giorni. La morbilità è stata del 30% e la mortalità dello 0%.
Obiettivo di questo studio è valutare, tramite infezioni sperimentali in suini SPF con due diversi ceppi di virus influenzale pandemico A/H1N1, la replicazione e l'eliminazione virale, l'insorgenza di sintomi clinici e l'eventuale possibilità di trasmissione a suini naïve a contatto.

MATERIALI E METODI

Virus

Per la prima infezione sperimentale è stato utilizzato il virus influenzale pandemico A/It/148/2009 (H1N1), isolato da un paziente e gentilmente fornito dalla dr.ssa Antonella Amendola, Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Milano. Il virus è stato propagato su coltura cellulare di cellule epiteliali umane (Caco-2) ed il titolo di infettività virale è stato espresso in dose infettante tessuto coltura 50% ($TCID_{50}$). Nella seconda infezione sperimentale è stato impiegato il virus pandemico A/Sw/Italy/290271/2009 (H1N1), isolato nel corso di un focolaio di influenza verificatesi a novembre 2009 in un allevamento suino a ciclo aperto del nord Italia. La sequenza completa del genoma del virus A/Sw/Italy/290271/2009 utilizzato nell'infezione sperimentale rivela un elevato grado di omologia con i virus influenzali pandemici già isolati e caratterizzati in altri Paesi ed è stata inserita in GenBank con i numeri di accesso da CY053616 a CY053623. Il ceppo influenzale è stato coltivato su uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni per via intra-allantoidea ed il titolo di infettività virale è stato espresso in dose infettante embrione 50% (DIE_{50}).

Infezione sperimentale

Nei laboratori di biosicurezza livello 3 del Reparto Animali da Laboratorio dell'IZSLER di Brescia sono state condotte due infezioni sperimentali, in suini SPF, testati prima dell'infezione sperimentale per la ricerca di anticorpi verso la Nucleoproteina A del virus influenza tramite ELISA competitiva e verificata la negatività.

- prima sperimentazione: due suini SPF di 4 settimane d'età sono stati infettati con $10^{5.6}$ $TCID_{50}$ A/It/148/2009 (H1N1) per via intratracheale. Un suino è stato sottoposto ad eutanasia previa sedazione farmacologica 3 giorni p.i. ed in sede necroscopica

sono stati prelevati polmone, trachea ed eseguiti tamponi nasali. Il secondo suino è stato prelevato 18 giorni p.i., che ha coinciso con la fine della sperimentazione;

- seconda sperimentazione: cinque suini SPF di 5 mesi d'età sono stati infettati con 10^8 $TCID_{50}$ A/Sw/It/290271/2009 (H1N1) per via intratracheale e subito dopo l'infezione sono stati posti a contatto con due suini SPF della stessa età. In tutti i suini sono stati eseguiti tamponi nasali al 2°, 4°, 7°, 9°, 11° e 14° giorno p.i. Campioni di sangue sono stati prelevati al 9°, al 14°, al 21° ed al 28° giorno p.i.

Tutti gli animali sono stati controllati clinicamente ogni giorno e nei primi 5 giorni post-infezione è stata rilevata la temperatura rettale.

Test sierologici:

I sieri dei singoli animali sono stati esaminati in parallelo con le metodiche descritte in seguito.

Per l'identificazione degli anticorpi nei confronti della nucleoproteina di tipo A (NPA), è stato impiegato un test immunoenzimatico di tipo ELISA competitiva, utilizzando un anticorpo monoclonale (Mab) anti-NPA ATCC HB65 (1) e il virus parzialmente purificato adsorbito alla piastra. I sieri sono stati esaminati diluiti 1/10 e 1/20. La ricerca di anticorpi sottotipo-specifici è stata eseguita tramite test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando gli antigeni suini sottotipo H1N1, H3N2, H1N2, H1N1 pandemico e l'antigene umano H1N1 pandemico, secondo metodica standardizzata (5, 11).

Identificazione virale:

L'evidenziazione dell'acido nucleico è stata effettuata mediante RT-PCR real time (rRT-PCR), secondo la metodica modificata descritta da Spackman (8) e avente come target il gene della Matrice (M).

I tamponi nasali sono stati risospesi in 1ml di PBS antibiotato, mentre dagli organi prelevati dal suino sacrificato nella prima infezione sperimentale sono stati preparati omogenati di tessuto al 10% (w/v) in terreno Minimum Essential Medium (MEM) contente antibiotici.

L'RNA virale è stato estratto a partire da 200 µl di omogenato di tessuto e di surnatante dei tamponi nasali. Dopo centrifugazione si è proceduto alla purificazione dell'RNA tramite Trizolo e precipitazione in isopropanolo. Il rilevamento del virus influenzale è stato eseguito tramite reazione One-step RT-PCR real time utilizzando il kit Quantitec Probe RT-PCR kit (Qiagen). La reazione amplifica un frammento di 99 nt del gene M.

Isolamento virale:

Gli omogenati di tessuto, i tamponi nasali del suino sacrificato, quelli di un suino infettato sperimentalmente con A/Sw/It/290271/2009 prelevati 7 giorni p.i. ed i tamponi eseguiti 9 giorni p.i. di un soggetto a contatto sono stati inoculati in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo (UEP) SPF di 9-11 giorni, secondo le indicazioni riportate dall'OIE (11). Le uova embrionate sono state osservate quotidianamente per verificare la vitalità dell'embrione. Dopo 4 giorni d'incubazione sul liquido allantoideo è stata eseguita la prova di emoagglutinazione (HA) ed una prova ELISA sandwich con Mab anti-NPA ATCC HB65 per l'identificazione virale.

RISULTATI

Prima infezione sperimentale:

Rilievi clinici

I suini infettati sperimentalmente hanno evidenziato una sintomatologia clinica respiratoria, con dispnea, scolo nasale, tosse e abbattimento del sensorio per 3 giorni p.i. ed è stato rilevato un rialzo termico ≥ 40°C per lo stesso periodo di tempo.

Rilievi anatomo-patologici

Il suino sacrificato mostrava alterazioni patologiche riferibili a influenza, con lesioni macroscopiche polmonari caratterizzate da aree di epatizzazione rossa soprattutto ai lobi apicali, edema interstiziale e diffusa iperemia della mucosa delle cavità nasali, della trachea e dei bronchi (Fig. 1). Evidente era anche l'edema della mucosa nasale con presenza di essudato siero-mucoso.

Figura 1: Polmone suino 3 giorni p.i.: aree multifocali di epatizzazione rossa.
Figure 1: Pig lungs at day 3 p.i.: multifocal areas of purple consolidation.

Risultati sierologici
Nel soggetto sperimentalmente infettato e prelevato il 18° gg p.i. è stata rilevata positività sierologica con la metodica ELISA e ha presentato un titolo di 20 IEA in HI con l'antigene umano H1N1 pandemico, mentre non sono stati riscontrati anticorpi (≤ 10) con gli antigeni suini sottotipo H1N1, H1N1 pandemico, H3N2 ed H1N2.
Isolamento virale
Il virus è stato reisolato dai tamponi nasali, dalla trachea e dal polmone prelevati 3 giorni p.i.
RT-PCR real time
Negli organi prelevati ed in particolare modo nei tamponi nasali è stata rilevata un'elevata carica di RNA virale.
Seconda infezione sperimentale:
Rilievi clinici
I suini infettati con il virus influenzale pandemico suino A/H1N1 non hanno manifestato sintomi clinici riferibili ad influenza durante la sperimentazione. E' stato, però, riscontrato un leggero rialzo della temperatura corporea per 3 giorni partendo dal primo giorno p.i. nei soggetti infettati e più accentuata nei soggetti posti a contatto nel medesimo box a partire dal 2° giorno p.i.

Risultati sierologici
Anticorpi anti-NPA e sottotipo H1-specifici sono stati rilevati rispettivamente in ELISA e in HI con antigene omologo a partire dal 9° giorno p.i. per i suini infettati e dal 14° giorno p.i.. per i soggetti a contatto. Tutti gli animali hanno mantenuti titoli elevati per l'intera durata della sperimentazione.
RT-PCR real time
I tamponi nasali di tutti i soggetti infettati, prelevati a 2, 4 e 7 giorni p.i., sono risultati positivi in rRT-PCR, mentre al 9 giorno p.i. solo due soggetti hanno avuto esito positivo. I tamponi dei suini a contatto sono risultati positivi al 4°, 7°, 9° e 11° giorno p.i.
Isolamento virale
Il virus è stato reisolato dai tamponi nasali prelevati a 7 giorni p.i. da uno dei suini infettati ed a 9 giorni p.i. da uno dei soggetti a contatto..

Discussione e conclusioni
Nel presente studio è stata osservata la capacità dei virus influenzali pandemici, utilizzati nelle sperimentazioni, di infettare e di replicare nei suini, come dimostrato dalla comparsa di sieroconversione.
Nella prima infezione sperimentale il virus influenzale pandemico A/It/148/2009 si è dimostrato in grado di infettare il suino, di causare un'infezione respiratoria acuta e di attivare la risposta immunitaria umorale specifica. Nella seconda infezione sperimentale, nella quale è stato utilizzato il virus A/Sw/It/290271/2009, questo virus ha indotto un modesto rialzo febbrile nei soggetti infettati sperimentalmente, si è diffuso rapidamente ed ha infettato suini posti a contatto, che hanno iniziato ad eliminare il virus 4 giorni p.i. Sulla base di questi risultati è possibile concludere che il virus pandemico A/H1N1 può diffondere rapidamente ed efficientemente se introdotto in un allevamento suino, aumentando di conseguenza il rischio di stabilire infezioni endemiche.
In bibliografia sono state segnalate diverse infezioni transitorie negli allevamenti suini ed in altre popolazioni animali, quali tacchini, animali domestici e, talvolta, anche specie esotiche.. Anche in Italia, le indagini condotte dall'IZSLER hanno portato all'isolamento di un virus influenzale pandemico in un allevamento suino del nord Italia, nel quale il virus pandemico è stato trasmesso dall'uomo ai suini, determinando un'infezione respiratoria endemica. Al momento attuale, non ci sono evidenze che il virus A/H1N1 pandemico si comporti in modo diverso rispetto ai virus responsabili della influenza suina classica.
Inoltre, l'allevamento suinicolo nel quale è stato isolato il virus influenzale pandemico è ubicato in pianura padana, area ad elevata densità zootecnica e nella quale sono state riscontrate nell'ultima decade numerose epidemie di influenza aviaria, sottotipo H5 ed H7. Considerato che i suini possono essere infettati da virus umani ed aviari, la co-circolazione di virus influenzali di diversa origine (umana, suina ed aviaria) nella popolazione suina potrebbe comportare lo scambio di materiale genetico tra virus diversi con emergenza di nuovi stipiti riassortanti.
Attualmente è in corso una verifica della patogenicità del virus pandemico in suini precedentemente infettati con ceppi H1N1 di lineaggio europeo, isolati in Italia negli ultimi anni. Tali sperimentazioni permetteranno di valutare l'impatto che la stabilizzazione di tale ceppo influenzale avrà negli allevamenti suinicoli.
Pur non sussistendo ad oggi alcuna prova che i suini svolgano un ruolo nella diffusione del virus A/H1N1 pandemico, l'OIE sollecita tutti i Paesi membri ad intensificare la sorveglianza di potenziali infezioni da virus influenzale nei suini ed a rafforzare le misure di biosicurezza negli allevamenti.

BIBLIOGRAFIA

1. De Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species". Arch. Virol. 115, 47-61
2. De Jong J.C., Paccaud M.F., de Ronde-Verloop F.M., Huffels N.H., Verwei C., Weijers T.F., Bangma P.J., van Kregten E., Kerckhaert J.A.M., Wicki F., Wunderli W. (1988) "Isolation of swine-like influenza A (H1N1) viruses from men in Switzerland and The Netherlands". Annu. Inst. Pasteur. Virol. 139, 429-437
3. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. (2009). N. Engl. J. Med. 360, 2605-2615
4. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E. and other authors (2009) "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans." Science 325, 197-201
5. Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) "Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance". Atlanta, U.S. Department of Health and Human service.
6. Myers K.P., Olsen C.W. and Gray G.C. (2007) "Cases of swine influenza in humans: a review of the literature." Clin. Infect. Dis. 44, 1084-1088
7. Shope R.E. (1931) "Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology." J. Exp. Med. 54, 373-385
8. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T. and 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. Clinic. Microbiol. 40, 3256-3260
9. Vincent A.L., Ma W., Lager K.M., Janke B.H. and Richt J.A. (2008) "Swine influenza viruses: a North American perspective." Adv. Virus Res. 72, 127-154
10. Wentworth D.E., Thompson B.L., Xu X., Regnery H.L., Cooley A.J., McGregor M.W., Cox N.J., Hinshaw V.S. (1994) "An influenza A (H1N1) virus closely related to swine influenza virus responsible for a fatal case of human influenza". J.Virol. 68, 2051-2058
11. Word Organisation for Animal Health (OIE) (2008). – Swine Influenza, Chapter 2.8.8. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed. OIE, Paris

CARATTERIZZAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI CIRCOLANTI NEL SUINO NEGLI ANNI 2008-2009 IN ITALIA

CHARACTERIZATION OF SWINE INFLUENZA VIRUSES CIRCULATING IN ITALY IN 2008-2009

FONI E[1].; CHIAPPONI C.[1]; SOZZI E.[2]; BARBIERI I.[2]; MORENO A.M.[2]; MERENDA M.[1]; LUPPI A.[3]; ALBORALI L.[2]; CORDIOLI P.[2]

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" Sezione di Parma; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini Sede di Brescia;
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" Sezione di Reggio Emilia

Parole Chiave: influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, analisi genetica

Key Words: swine influenza, H1N1,H1N2, H3N2, genetic analysis

Riassunto: Negli anni 2008 e 2009 nell'ambito della attività diagnostica routinaria delle forme respiratorie del suino, sono stati raccolti, da allevamenti del Nord Italia, 1854 campioni di polmoni e tamponi nasali che sono stati sottoposti ad analisi tramite RT-PCR per la ricerca del virus influenzale suino. A partire dai campioni risultati positivi alla prova biomolecolare, 114 nel 2008 e 102 nel 2009, sono stati isolati rispettivamente 52 (25 H1N1, 7 H1N2 e 20 H3N2) e 54 stipiti virali stipiti virali (21 H1N1, 19 H1N2, 13 H3N2 e 1 H1N1 Pandemico 2009). Sono stati selezionati 24 virus sui quali sono state eseguite analisi genetiche. Gli studi genetici hanno confermato, per quanto riguarda i virus H1N1, una distribuzione omogenea nell'ambito del gruppo di virus europei "avian-like" rappresentati dallo stipite di referenza A/sw/Finistere/2899/82. I virus H3N2, per quanto riguarda la sequenza dell'emoagglutinina (HA) dimostrano ancora una stretta correlazione con l' HA del virus progenitore A/Port Chalmers/73, mentre la sequenza della neuroaminidasi (NA) si avvicina a quella di recenti stipiti suini tedeschi di virus H1N2. L'analisi genetica dei virus del sottotipo H1N2 ha invece evidenziato in questi virus italiani la presenza di riassortanti la cui HA dimostra di essere correlata a quella tipica dei virus H1N2 europei, mentre la NA chiaramente distinta da questi e risulta invece molto vicina alle caratteristiche genetiche della NA di virus umani H3N2 di recente isolamento.

Abstract: Samples from 1854 outbreaks of respiratory disease in Italian pig farms, collected in 2008-2009, were submitted to RT-PCR for influenza virus M gene. From 114 RT-PCR positive samples collected in 2008, 52 swine influenza viruses (SIVs) were isolated and subtyped (25 H1N1, 7 H1N2 and 20 H3N2). From 102 RT-PCR positive samples collected in 2009, 54 SIVs were isolated and subtyped (21 H1N1, 19 H1N2, 13 H3N2 and 1 H1N1 Pandemic 2009). Genetic and phylogenetic analysis of H1N1 strains showed a low degree of etherogeneity, confirming the circulation of viruses referring to the "avian–like" Sw/Finistere/2899/82. Haemoagglutinin (HA) of H3N2 SIVs showed to be strictly correlated to the reference strain A/Port Chalmers/73, while it was demonstrated that the neuroaminidase (NA) was correlated to NA of recent German

H1N2 SIVs. Phylogenetic analysis of H1N2 SIVs showed that these recent Italian strains were reassortant strains carrying the HA closely related to European H1N2 SIVs and the NA to the recent H3N2 human influenza virus.

INTRODUZIONE

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia Orthomixoviridae, genere Influenzavirus che comprende tre tipi: A, B e C. Gli uccelli selvatici degli ambienti acquatici sono considerati la riserva naturale del virus influenzale tipo A che sono in grado di infettare varie specie animali, uomo compreso. Gli stipiti vengono classificati a seconda delle caratteristiche dei determinanti antigenici di superficie, l'emoagglutinina (HA) e la neuroaminidasi (NA), antigeni coinvolti in modo determinante nei processi di infezione a livello delle cellule bersaglio e nella stimolazione del sistema immunitario. Nella specie suina l'evoluzione clinica è determinata dalle caratteristiche intrinseche del sottotipo virale, dalla situazione immunitaria di popolazione, ma anche dall'intervento di infezioni secondarie e dalle condizioni di allevamento. L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina (SIV) ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina italiana di tre diversi sottotipi H1N1, H3N2, H1N2. Inoltre nel corso del 2009 è stata accertata, se pur limitata a due focolai, la circolazione del virus "A H1N1 Pandemic 2009" anche nell'allevamento suino (Moreno A.M. com. pers.).

L' Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) svolge monitoraggio della presenza del SIV nel Nord-Italia, area ad elevata densità di allevamenti suini ed aviari, da oltre 30 anni.

Sulla base dei dati virologici raccolti negli ultimi 10 anni dall'IZSLER, l'incidenza dei tre sottotipi nei casi di malattia respiratoria è del 46% per H1N1, 28% per H1N2 e del 26% per H3N2.

I virus influenza A, e quindi anche i SIV, vanno incontro nel tempo a continue evoluzioni antigeniche determinate dall'accumulo di mutazioni a livello dei tratti gnomici. Si tratta di mutazioni puntiformi, sostituzione, delezione e/o inserzione di basi che determinano differenze aminoacidiche a livello dei determinanti antigenici. Modifiche antigeniche si possono anche verificare per fenomeni di riassortimento cioè per scambio di tratti di genoma fra due o più virus influenzali che coinfettano lo stesso animale, anche provenienti da specie diverse (Kuntz-Simon et al. 2009). Presso i laboratori di Virologia della Sede e della Sezione Diagnostica di Parma è stato messo in atto un sistematico programma di screening per il monitoraggio dei ceppi di SIV circolanti e delle loro caratteristiche antigeniche e genetiche. Tale programma copre territorialmente la maggior parte delle aree nazionali con allevamento intensivo del suino (80% dei suini allevati in Italia), dove al sistema di allevamento tradizionale a ciclo chiuso ed aperto si è in parte affiancato l'allevamento multi-sito.

Si riportano in questo studio i risultati della sorveglianza della circolazione dei vari sottotipi di SIV nella popolazione suina negli anni 2008 e 2009 con particolare attenzione alla evoluzione delle caratteristiche antigeniche e genetiche degli stipiti isolati.

MATERIALI E METODI

Nel corso dell'attività diagnostica svolta dai laboratori della Sezione Diagnostica di Parma, Reggio Emilia e Brescia negli anni 2008 e 2009 sono stati raccolti, rispettivamente, 959 e 895 campioni diagnostici , per un totale di 1854, rappresentati da polmoni e tamponi nasali provenienti da allevamenti del Nord Italia nei quali era stata rilevata presenza di sintomatologia clinica respiratoria. Nei Laboratori di Virologia delle rispettive Sezioni Diagnostiche, i campioni sono stati sottoposti a trattamento di omogeneizzazione e sono

stati esaminati con test biomolecolare di RT-PCR (Spackman et al. 2002) per la ricerca del genoma virale del virus dell'influenza. I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a prove di isolamento virale su uova embrionate di pollo e colture cellulari, utilizzando linee stabilizzate MDCK e CACO2 (Chiapponi et al. 2010). Il sottotipo virale degli stipiti isolati è stato identificato tramite inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) utilizzando sieri iperimmuni di pollo nei confronti di virus di referenza (OIE 2008) e tramite tecnica PCR (Chiapponi et al. 2003). Dal Settembre 2009 i campioni risultati positivi al test biomolecolare sono stati anche esaminati tramite RT-PCR per la ricerca del genoma del virus H1N1 pandemico 2009 (CDC 2009).
Tra gli stipiti isolati sono stati scelti 24 virus sui quali sono state eseguite analisi genetiche tramite sequenziamento parziale di HA1 e NA (792 pb per N2 e 514 per N1) (Chiapponi et al. 2007). Le reazioni di sequenza sono state effettuate con il metodo dell'incorporazione di terminatori desossinucleotidici trifostati fluorescenti (BigDye Terminator kit, Applied Biosystem), impiegando gli stessi primers utilizzati nell'amplificazione e sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga3130 (Applied Biosystems). L'analisi filogenetica (MEGA 4, metodo della massima parsimonia) è stata effettuata confrontando le sequenze ottenute con quelle ad altri virus influenzali suini, umani ed aviari, disponibili in GeneBank dopo allineamento multiplo con metodo ClustalW.

RISULTATI

Nel corso dell'anno 2008 sono stati esaminati tramite RT-PCR, 959 campioni di estratto di tessuto polmonare o tampone nasale, tramite questa analisi sono stati individuati 114 campioni positivi per la presenza del gene della matrice del virus influenzale A, che rappresentano il 12% dei focolai di sintomatologia respiratoria indagati. Da questi campioni, sottoposti a prove di isolamento virale, è stato possibile isolare 52 stipiti virali ripartiti così fra i sottotipi: 25 H1N1, 7 H1N2 e 20 H3N2.
Nel corso dell'anno 2009, sono stati esaminati 895 campioni tra i quali sono stati individuati 102 campioni positivi per influenza tramite RT-PCR (11%) dai quali sono stati isolati 54 stipiti virali : 21 H1N1, 19 H1N2 , 13 H3N2 e un virus riferibile allo stipite A H1N1 pandemico 2009, virus responsabile della Pandemia influenzale umana 2009 (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009). I dati sono stati raccolti nella Tabella 1.

Tabella 1: Risultati delle indagini biomolecolari e virologiche per ricerca virus influenzale eseguite su campioni diagnostici raccolti in corso di sindrome respiratoria nel suino negli anni 2008-2009

ANNO	TOTALE ESEGUITI	ESITO PCR		ISOLATI			
		NEGATIVI	POSITIVI	H1N1	H1N2	H3N2	H1N1 pandemico
2008	959	845	114 (12%)	25	7	20	/
2009	895	793	102 (11%)	21	19	13	1

H1N1

L'analisi filogenetica dei virus H1N1 analizzati nello studio mostrano una distribuzione omogenea nell'ambito del gruppo di virus europei derivanti da virus con HA "avian-

like" rappresentati dallo stipite di referenza A/sw/Finistere/2899/82 (Fig.1). Tuttavia, sporadicamente sono stati isolati virus riassortanti con HA di origine umana (A/swine/Italy/284997/09 in Fig. 1). Per quanto riguarda il gene NA dei virus H1N1 si è osservata una relativa omologia delle sequenze italiane che risultano correlate con sequenze di virus suini europei contemporanei che hanno come capostipite il virus di riferimento A/sw/Finistere/2899/82 (Fig. 2).
Il virus H1N1 pandemico A/Sw/290271/2009 è stato isolato a novembre 2009 in suinetti sottoscrofa di un allevamento suino a ciclo aperto del Nord Italia. La sequenza completa del genoma virale rivela un elevato grado di omologia con i virus influenzali pandemici già isolati e caratterizzati in altri Paesi (Moreno A.M. com. pers.).

H1N2

L'analisi delle sequenze del gene HA ha evidenziato che i ceppi H1N2 formano un cluster chiaramente distinguibile dal gruppo dei ceppi H1N1 (Fig. 1) come atteso, in quanto posseggono una HA di origine umana. In particolare tutti i recenti isolati originano dallo stipite italiano A/sw/it/1521/98 con cui condividono la delezione di due residui aminoacidici nelle posizioni 147 e 148 all'interno della regione HA1. Tuttavia la percentuale di omologia (non superiore al 95%) suggerisce che i virus H1N2 si stiano evolvendo e vadano a costituire un gruppo estremamente omogeneo.
Per quanto riguarda invece la sequenza del gene NA, si è osservato lo stabilirsi della circolazione di ceppi con N2 strettamente correlata alla NA di virus H3N2 umani recentemente circolanti. In particolare i virus H1N2 originatesi dallo stipite italiano A/sw/it/1521/98 mostrano un'elevata omologia per quanto riguarda la NA con un virus H3N2 umano di origine asiatica (A/Hong Kong/CUHK20199/97) (Fig. 3).

H3N2

Il gene HA dei virus H3N2 selezionati mostra un'elevata correlazione con il virus A/ Port Chalmers/1/73 e rispetto agli anni precedenti non si registra una particolare evoluzione(Fig. 3). Per quanto riguarda il gene N2, la maggior parte dei virus presi in considerazione risultano essere maggiormente correlati a virus H1N2 riassortanti tedeschi di recente isolamento. (Fig. 4)

DISCUSSIONE

I dati raccolti nel corso di questo studio dimostrano che il virus influenzale è ancora attivamente circolante nell'allevamento suinicolo intensivo italiano e responsabile dell'insorgenza di forme respiratorie primarie. Le indagini virologiche hanno evidenziato, infatti, percentuali rilevanti di risultati positivi, del 12% e del 11%, rispettivamente negli anni 2008 e 2009.
L'identificazione dei sottotipi di virus influenzale circolanti ha evidenziato la continua e pressoché paritaria circolazione di tutti i tre sottotipi H1N1(46 isolati), H1N2 (23 isolati) e H3N2 (43 isolati) nel corso dei due anni considerati. L'incidenza del sottotipo H1N1 è rimasta costante nel corso dei due anni, mentre è stata osservata una diminuzione degli isolamenti di virus H3N2 nel 2009 (13 isolati) rispetto al 2008 (20 isolati). Per contro si è assistito ad un aumento di virus sottotipo H1N2 isolati nel 2009 (21 isolati) rispetto al 2008 (7 isolati). Questa tendenza potrebbe essere ricollegata al fatto che negli ultimi due anni si è osservato una progressiva divergenza delle caratteristiche genetiche della NA del sottotipo italiano H1N2 da quelle della NA degli stipiti H1N2 preesistenti (Moreno et al. 2009) che più si avvicinavano alle caratteristiche dei virus nord europei (Chiapponi et al. 2007). Infatti le caratteristiche della NA dei virus H1N2 oggi più frequentemente isolati sul territorio, si avvicinano sempre più alle NA di virus umani di recente circolazione. Questi cambiamenti potrebbero aver facilitato la circolazione di tali virus nell'ambito della

popolazione suina, immunologicamente non sensibilizzata nei confronti di una NA diversa, sia da quella presente nei sottotipi H1N2 di precedente circolazione, sia da quella del sottotipo H3N2 stabilizzato nel suino. La circolazione di questo sottotipo sembra quindi affermarsi alla pari con il sottotipo H1N1 nei nostri allevamenti.
L' Italia, insieme al Belgio, la Spagna e la Germania si conferma essere un'area geografica in cui il sottotipo H3N2 ,se pur con alterna fortuna, continua a circolare attivamente, mentre sembra non essere più presente in altri paesi europei come la Francia e la Gran Bretagna (Kyriakis et al. 2009, Kuntz-Simon at al. 2009)
I risultati di questo studio, considerando l'elevato numero di casi esaminati, può inoltre rassicurare sulla scarsa circolazione e diffusione del virus A H1N1 pandemico 2009 nei nostri allevamenti (0,11% dei casi di sintomatologia respiratoria considerati), a fronte di una elevata circolazione nella specie umana (8% su scala mondiale) nello stesso spazio temporale (WHO 2009) .
Nel corso di questi due anni è stata anche osservata la presenza di stipiti H1N1 riassortanti con HA di origine umana acquisita da virus H1N2 suino, che però non hanno mostrato capacità diffusive, rimanendo segnalazioni sporadiche.

Figura n.1: Albero filogenetico gene H1

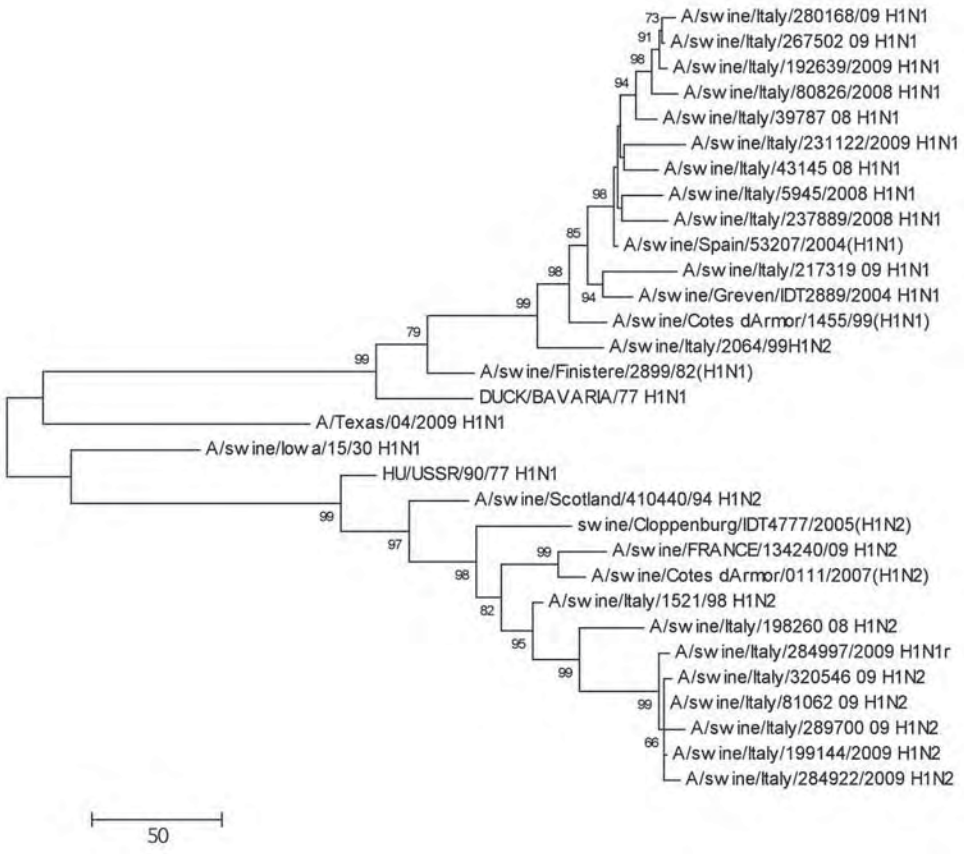


Figura n. 2: Albero filogenetico gene N1

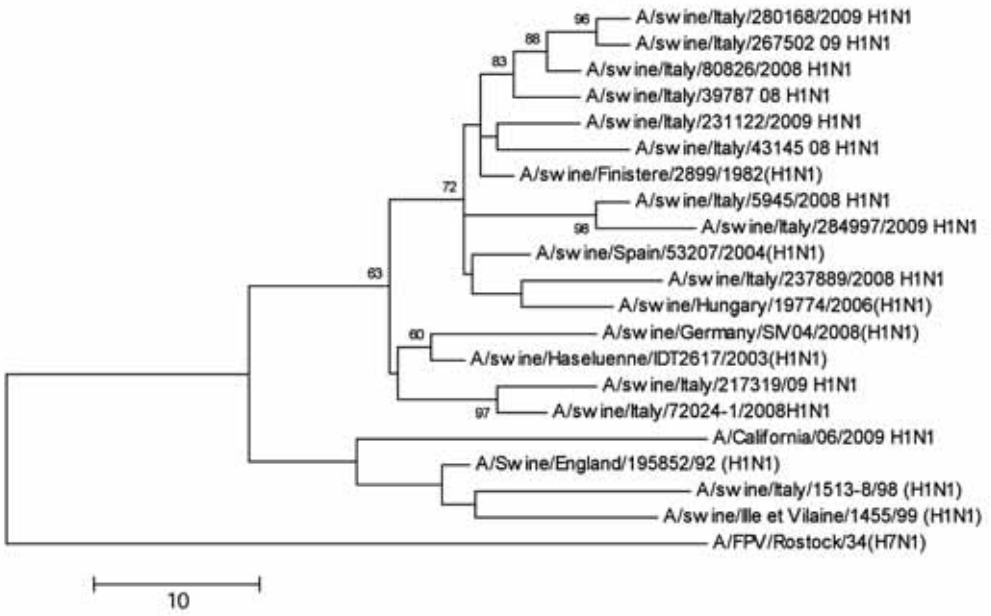


Figura n. 3: Albero filogenetico gene H3

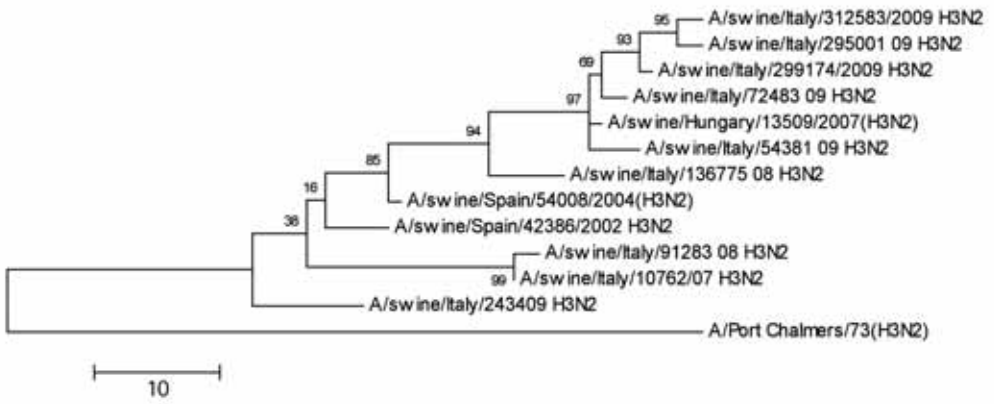
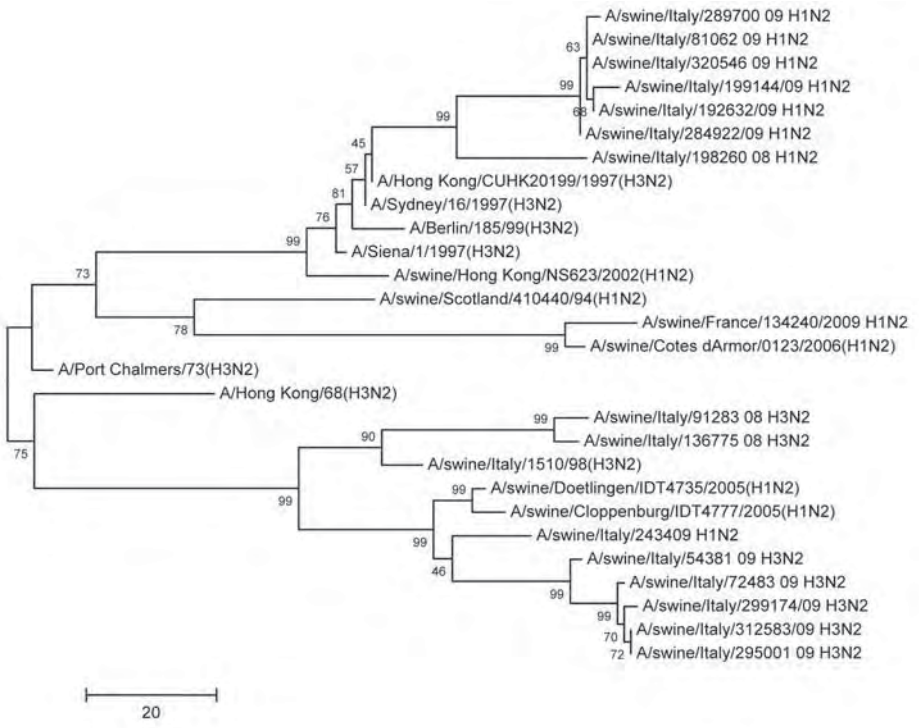


Figura n.4: Albero filogenetico gene N2



BIBLIOGRAFIA:

CDC (2009) CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf

Chiapponi C., Fallacara F. and Foni E. (2003) Subtyping of H1N1, H1N2 and H3N2 swine Influenza Viruses by two multiplex RT-PCR 4th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases PRRS-PMWS-Swine Influenza. Roma 29 Giugno-2 Luglio. 257-258

Kuntz-Simon G, Madec F. (2009) Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. Zoonoses Public Health. May 28. [Epub ahead of print]

Chiapponi C., Barbieri I., Manfredi R., Zanni I., Barigazzi G., Foni E.. (2007)Genetic diversity among H1N1 and H1N2 Swine Influenza viruses in Italy: preliminary results. Proceedings of PMWS PRRS SWINE INFLUENZA and associate diseases. Krakow 24th / 27th June. 261

Chiapponi C, Zanni I, Garbarino C, Barigazzi G, Foni E. (2010) Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses. J Virol Methods Jan;163(1):162-5. Epub 2009 Sep 23.

Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen SC, Chiapponi C, Van Reeth K. (2009) Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. Zoonoses Public Health. Dec 23. [Epub ahead of printOIE, ed, 2008.

Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med. Jun 18;360(25):2605-15. .

OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. Office International des Epizooties , Paris

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. (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. Sep;40(9):3256-60.

World Health Organisation (WHO), (2009) CSR, Disease Outbreak News, Wed 30 Dec. http://www.who.int/csr/don/2009_12_30/en/index.html

Moreno A, Barbieri I, Sozzi E, Lelli D, Fontana R, Alborali L, Cordioli P (2009) Virus influenzali suini H1N2 in Italia: presenza di ceppi riassortanti. Atti XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 25. Parma 30 settembre 2009

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI PESTE SUINA CLASSICA IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO

DESCRIPTION OF AN OUTBREAK OF CLASSICAL SWINE FEVER IN A CLOSE CYCLE UNIT

POZZI P.S.[1], OZARI R.[2], HADANI Y.[2], DAVID D.[3], YADIN H.[3], DIKIE S.[4], BASHARA R.[5], KING R.[6], PERL S.[3]

[1]SP-Intervet, Israel; [2]The Veterinary Services of The State of Israel, Bet Dagan; ;
[3]The Veterinary Institute "Kimron", Bet Dagan, Israel;
[4]Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany;
[5]Veterinarian, Tarshia, Israel; [6]The Israel Nature and Parks Authority, Jerusalem, Israel.

Parole chiave: Peste Suina Classica; lesioni emorragiche; aborto; mortalita'; suino selvatico, RT-PCR
Key words: Classical Swine Fever; hemorrhagic lesions; abortion; mortality; wild boars, RT-PCR

Riassunto
In un allevamento a ciclo chiuso di 425 scrofe situato nel nord di Israel si e' verificato un focolaio di Peste Suina Classica (PSC) che ha comportato perdite complessive, tra mortalita' indotta da malattia ed abbattimenti, pari a 267 scrofe (62,8% del totale), 4 verri (su 6) ed 828 soggetti da ingrasso (41,4% del totale) ed aborti non quantificati.
La malattia, probabilmente in seguito a contatto con suini selvatici, si e' sviluppata nelle scrofe in gestazione con febbre intensa, cianosi, aborto, zoppicature, vomito, mortalita' (24,8% delle scrofe e 2 verri). Le lesioni anatomopatologice hanno evidenziato emorragie sulla pleura parietale, diaframma, epicardio, congestione ed emorragia linfonodale, lesioni necrotice al piccolo intestino, lesioni emorragiche al rene. La PSC e' stata confermata tramite test ELISA anticorpo su siero di sangue; ELISA antigene su omogenato d'organi e Real Time – Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) su sangue ed organi. Campioni di sangue e d'organi da suini selvatici evidenziati in zona sono anch'essi risultati positivi a PSC.
In seguito alla conferma di PSC e' stato effettuato un abbattimento dei soli soggeti malati e la vaccinazione della restante popolazione sia dell'allevamento coinvolto che della zona circostante.

Summary
In a close cycle unit of 425 sows, located in the Northern Region of Israel, a Classical Swine Fever outbreak occurred, which induced the loss of 267 sows (62,8% of total sows population), 4 boars (out of 6) and 828 growing-fattening pigs (41,4% of total) among direct mortality and partial stamping out, further that non quantified abortions.
Involvement of wild boars in contact with sows was suspected. PSC outbreak started in sows in the pregnancy unit with high fever, cyanosis, abortions, lameness, vomit, mortality (24,8% of sows and 2 boars). At necropsy, hemorrhages were present on parietal pleura, diaphragm, epicardium and kidney; lymph-nodes were congested and hemorrhagic; necrotic lesions were present on small intestine. CSF was confirmed with ELISA-antibody on blood serum; with ELISA-antigen on organs homogenate and Real Time – Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) on blood and organs. Samples from blood and organs from wild boars in the area also resulted positive to CSF. Following confirmation of CSF a stamping out of diseased animals and vaccination of remaining population in the farm and surrounding area was implemented.

Introduzione

La Peste Suina Classica (PSC) e' una malattia virale, multisistemica, a carattere emorragico, altamente contagiosa, causata da un Pestivirus, RNA virus a singola catena, appartenente alla famiglia dei *Flaviviridae*. La PSC colpisce sia suini d'allevamento che selvatici, ed il suino selvatico e' considerato il serbatoio del virus della PSC. La trasmissione avviene per via oro-nasale, con prima replicazione del virus a livello di tonsille, passaggio per via linfatica ai linfonodi regionali della testa e viremia. La gravita' della malattia varia da lieve a severa ed e' in grado di causare perdite rilevanti negli allevamenti colpiti. (1)

I segni clinici della PSC sono rappresentati da febbre, arrossamento intenso della cute, sino alla cianosi, incoordinazione motoria (particolarmente agli arti posteriori), diarrea, polmonite. Tra i soggetti gravidi e' presente l'aborto (1).

Si riconoscono tre forme cliniche: acuta; cronica; congenita o prenatale (1).

Forma acuta: e' caratterizzata da leucopenia e trombocitopenia; diffuse petecchie emorragiche ed ecchimosi, specialmente sulla cute, nei linfonodi, nella laringe, nella vescica, nei reni (lesioni punteggiate a capocchia di spillo; cosiddetto "rene a uovo di tacchino") e valvola ileo-ciecale. L'infarcimento emorragico multifocale della milza e' caratteristico, ma non sempre presente. I linfonodi sono ingrossati ed emorragici. Sono presenti lesioni al sistema nervoso centrale (SNC) sotto forma di encefalomielite ed infiltrati cellulari perivascolari.

Forma cronica: sono presenti lesioni ulcerose (cosiddetti "bottoni") nel ceco e grosso intestino; deplezione generalizzata dei tessuti linfoidi; mentre le lesioni infiammatorie ed emorragiche sono spesso assenti.

La forma congenita e' caratterizzata da microencefalia; ipoplasie cerebellare e polmonare; dismielinogenesi a livello di SNC.

La diagnosi differenziale per PSC si pone nei confronti di Peste Suina Africana (PSA), infezione da Virus della Diarrea Virale Bovina (BVD), Salmonellosi, Mal Rosso, Streptococcosi, Leptospirosi, Pasteurellosi acuta, avvelenamento da cumarinici o anticoagulanti

La diagnosi si basa su lesioni patologiche ed istopatologiche, su dimostrazione dell'antigene virale tramite Polimerase Chain Reaction – Real Time (PCR-RT) o tramite test di Immuno Fluorescenza (IF) su sezioni criostatiche da reperti autoptici; su isolamento del virus; su dimostrazione di sieroconversione verso il virus della PSC, sia con test ELISA che Siero Neutralizzazione (SN)

Questo lavoro descrive gli aspetti clinici, anatomopatologici ed istopatologici di un focolaio di PSC in un allevamento di 425 scrofe a ciclo chiuso nel Nord di Israele.

Materiali e metodi

Premesse zootecniche.

La suinicoltura in Israele e' relativamente ridotta, dato lo scarso consumo di carne suina per motivi religiosi da parte della popolazione Ebraica e Musulmana, ed e' costitutita da 185,000 suini macellati nel 2008 (2) provenienti da 24 allevamenti a ciclo chiuso, di cui 23 concentrati nella Regione Nord di Israele e di questi 16 in un unico comprensorio e talmente vicini da costituire un tutt'uno epidemiologico.

Localizzazione e descrizione clinica del focolaio.

Il focolaio di PSC in oggetto si e' verificato in un allevamento a cico chiuso di 425 scrofe e 6 verri (con presenti 2000 suini da ingrasso di varie eta'), situato all' estremo Nord di Israele, a 3,5 km dal confine con il Libano, riconoscuta zona di passaggio di suini selvatici (Fig. 1)

L'allevamento e' costituito da diverse strutture separate le une dalle altre (Fig.2). I segni clinici si sono verificati nel reparto scrofe gravide e verri, che e' situato a circa 70 metri dal restante complesso sale parto, svezzamento ed ingrasso (Fig.2). L'allevamento non presenta recinzioni o barriere; il reparto scrofe e verri in oggetto risulta a sua volta provvisto di ampi

accessi dall'esterno (anche necessari in estate per garantire una ventilazione naturale).
I primi segni comparivano il 15/02/09 in una scrofa, di recente inseminata con seme d'importazione, che dimostrava debolezza, temperatura elevata (oltre 41°C), arrossamento della pelle. Diagnosticata clinicamente per Mal Rosso e sottoposta e trattamenti antibiotici (associazione di Penicillina–Streptomicina) non mostrava segni di miglioramento. Il 16/02/09 la stessa sintomatologia compariva in altre due scrofe nello stesso box, di cui una moriva. In breve tempo il numero delle scrofe colpite aumentava, sino a coinvolgere un intero box sui 7 presenti (Fig.3).
Il giorno 19/02/09 si verificavano i primi aborti; altre scrofe presentavano anoressia, presenza di arrossamento piu' o meno esteso sulla pelle, zoppicatura, difficolta' ad alzarsi ed a deambulare, in particolare sugli arti posteriori.
Il giorno 20/02/09 molte scrofe rimanevano in decubito laterale (Fig.3), con respiro addominale, tosse, vomito ed alcuni casi di melena. 2 verri sui 6 presenti presentavano segni di malattia, inclusi arrossamenti intensi sullo scroto.
La mortalita', dal 16/02 al 24/02 ammontava a 7 scrofe. I giorni 23-24/02/09, vengono eseguite in azienda le prime necroscopie con la partecipazione dei Servizi Veterinari. Le scrofe decedute presentano cianosi cutanea che puo' estendersi all'intera superfice corporea (Fig. 4). Alla necroscopia i primi riscontri sono relativi a soffusioni e petecchie emorragie in cavita' addominale, toracica (pleura parietale) (Fig.5), epicardio (Fig.6) e sul diaframma.
Si riscontrano polmonite intestiziale con focolai emorragici (Fig.7) e, in altri casi, intensa ed estesa pleurite fibrinosa (Fig 8), probabilmente in seguito ad irruzione di patogeni respiratori secondari. La milza e' in alcuni casi aumentata di volume (Fig. 9). I linfonodi sono congesti ed aumentati di volume (Fig.10), al taglio presentano emorragie periferiche frastagliate (c.d.lesioni "a carta geografica") (Fig.11); i reni presentano petecchie emorragiche multifocali (c.d. rene ad "uovo di tacchino") (Fig. 12) ed, al taglio, emorragie nello spessore della corticale (Fig.13). Il piccolo intestino presenta lesioni necrotiche multifocali (Fig 14) Da segnalare che dal 15/02 al 24/02, i segni clinici sono limitati al settore gestazione sopra menzionato, mentre sale parto e svezzamento-ingrasso non evidenziano problemi particolari.
Vengono eseguiti prelievi di sangue dalle scrofe clinicamente colpite e raccolti campioni d'organo (polmone; linfonodi; tonsille; milza; fegato; rene; SNC; tessuto muscolare) dalle scrofe sottoposte a necroscopia e da feti abortiti.
I riscontri clinici e necroscopici, soprattutto le lesioni emorragiche agli organi interni ed al rene in particolare, orientano verso il sospetto di Peste Suina Classica.
In concomitanza al focolaio ed inprossimita' dell'allevamento, tra il 28/02/09 ed il 03/03/09, venivano individuati ed abbattuti due suini selvatici dall'aspetto malato. Un'ispezione accurata da parte dei Veterinari dello "Israel Nature and Park Autority" riusciva a ritrovare 10 suini selvatici morti, verosimilmente in date diverse, in un raggio di 4 km dall'allevamento stesso. Dai soggetti in migliori condizioni venivano prelevati campioni di sangue ed omogenati d'organo per gli accertamenti diagnostici.

Indagini di laboratorio.
Le indagini di laboratorio sono state finalizzate alla conferma del sospetto di PSC ed inoltre all'esclusione di Peste Suina Africana (PSA), Sindrome Epidermite-Nefrite da Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2), Pasteurellosi acuta, Clostridiosi da *C. Novji* (3) intossicazione da Aflatossine, Citrinina, Ocratossina (4). La Sindrome Respiratoria e Riproduttiva Suina (PRRS) non e' stata oggetto di investigazione, essendo il Paese negativo al virus della PRRS.
24 campioni di sangue, da scrofe con segni clinici e non, sono stati centrifugati, sierati e sottoposti a test ELISA indiretto per l'individuazione di anticorpi verso il virus della PSC

utilizzando PrioCHECK CSFV-Ab (Prionics; Lelystad, NL). Il test rileva la presenza di anticorpi anti-proteina E2 del virus della PSC (1, 5).
I 24 campioni di sangue sono stati sottoposti anche a test ELISA indiretto per l'individuazione di anticorpi verso il Virus della Diarrea Virale Bovina (BVD), secondo le metodiche in uso presso il "Kimron Veterinary Institute", Bet Dagan, Israele.
6 omogenati d'organo da scrofe sottoposte a necroscopia; 1 omogenato d'organi da feti abortiti ed 1 omogenato d'organi di suino selvatico sono stati sottoposti a test ELISA diretto per l'individuazione dell'antigene virale della PSC utilizzando PrioCheck CSF-Ag (Prionics; Lelystad, NL). Il test e' in grado di rilevare il virus della PSC in sangue intero, plasma, siero ed organi.
Entrambi i test ELISA per PSC (indiretto e diretto) sono stati eseguti presso il "Kimron Veterinary Institute".
Successivamente, 7 tra i campioni di sangue prelevati in allevamento; 6 omogenati d'organo da scrofe; 1 omogenato di feto, 3 campioni di sangue da suini selvatici e 2 omogenati da suini selvatici sono stati inviati all'Istituto di Virologia della Facolta' di Medicina Veterinaria di Hannover (G), che e' Laboratorio di Riferimento OIE per il virus della PSC. I campioni sono stati sottoposti a RT-PCR verso il virus della PSC (6). I risultati sono espressi comel valore numerico di Ct (Cycle threshold). I valori di Ct oscillano in un range tra ≤ 29 (reazione fortemente positiva; elevata quantita' di acido nucleico target) e ≥ 40 (reazione debolmente positiva o dubbia; minima quantita' di acido nucleico target o contaminazione ambientale). Il dettaglio del campionamento e dei risultati ottenuti e' riassunto in Tabella 1.
Inoltre, presso il Kimron Veterinary Institute, stati eseguiti esami istologici da campioni di tonsilla, linfonodo, milza, fegato, rene, cervello e muscolo scheletrico dai soggetti sottoposti a necroscopia.

Risultati
I risultati dei test virologici e sierologici, finalizzati alla conferma della diagnosi di PSC, sono riassunti in Tabella 1
Il test RT-PCR, eseguito all'Istituto di Virologia di Hannover, ha evidenziato valori Ct fortemente positivi nei confronti dell'antigene PSC, confermando cosi i risultati ottenuti al test ELISA-Antigene ottenuti localmente.
Il campione d'organo risultato "dubbio" al Test Elisa Antigene PSC e' successivamente risultato negativo al test RT-PCR.
Il test Elisa Antigene PSC ha inoltre escluso la contaminazione da virus della PSC nelle residue dosi da inseminazione di importazione rimaste in allevamento.

Gli esami istologici hanno evidenziato (sinteticamente):
- tonsilla: tonsillite necrotica a focolai; infiltrazione di mononucleati e scarsi neutrofili
- linfonodo: deplezione linfocitaria; focolai di necrosi nei linfonodi epatici e pancreatici.
- milza: deplezione linfocitaria; diffuse emorragie sub-capsulari e parenchimali
- fegato: infiltrati mononucleari focali
- rene: (emorragie multifocali in corticale ed) infiltrati mononucleati focali
- intestino – ileo: necrosi focali sulla mucosa; deplezione linfocitaria; accumuli di fibrina, neutrofili e detriti cellulari
- cervello: gliosi focale: peri-vasculiti; meningo-encefalite non purulenta; necrosi focale.
- muscolo scheletrico: emorragie peri-misiali; necrosi delle fibre muscolari) (Fig. 15) (7) Le lesioni necrotico-emorragiche possono spiegare le zoppie e l'andamento dolorante delle scrofe.

Evoluzione del focolaio.
La mortalita' complessiva imputabile a PSC dal 15/02/09 al 22/03/09 ammonta a 103 scrofe su 425 (24%); a 2 verri su 6; ad aborti non quantificati.
A seguito delle conferme sierologiche e virologiche relative a PSC, tra il 10/03/09 ed 15/03/09 i Servizi Veterinari decidono contemporaneamente per la eliminazione dei soli soggetti "malati" nell'allevamento in oggetto e per la vaccinazione dei soggetti clinicamente sani. L'allevamento e' isolato rispetto ad altri allevamenti ma, per precauzione, viene deciso di estendere la vaccinazione ad altri piccoli allevamenti situati a pochi Km di distanza e posti nelle immediate vicinanze del macello di conferimento per i suini della Regione. Allo scopo viene utilizzato un vaccino vivo attenuato liofilizzato, ceppo Cinese 'CL", a concentrazione 100 PD50* per dose (2 ml). I riproduttori sono vaccinati due volte a distanza di 30 giorni, inclusi i sogetti gravidi, mentre i soggetti da ingrasso sono vaccinati una sola volta, a partire dai suinetti dai 7 giorni di vita in avanti (8).
Sebbene il vaccino in oggetto, in prove di vaccinazione ed infezione sperimentale, sia stato in grado di bloccare la riemissione di virus di challenge in tempi brevissimi (9), lo sviluppo del focolaio in campo non si arresta prontamente: a partire dal 19/03/09 iniziano a comparire segni clinici, sovrapponibili a quelli gia' descritti, nei reparti di svezzamento e magronaggio/ingrasso. Questi segni si prolungano per circa un mese e sino al 18/04/09 comportano la mortalita' di 123 soggetti in svezzamento e 232 soggetti in magronaggio/ingrasso, oltre che di alcune altre scrofe.
Le perdite complessive, tra malattia ed abbattimenti, ammontano a 267 scrofe, 4 verri e 828 soggetti da ingrasso.

** PD50 : dose protettiva 50; dose in grado di proteggere il 50% della popolazione da una prova di infezione sperimentale*

Discussione e Conclusioni
Il focolaio di PSC sopra descritto costituisce la prima segnalazione relativa a PSC in Israele e, piu' in generale, non sono stati sinora riportati episodi di PSC dall'area Medio-Orientale, per cui questo focolaio costituisce un'importante riscontro di tipo epidemiologico generale (12).
Sebbene sia ancora incerto come la malattia sia stata introdotta nel Paese, la concomitante conferma di PSC in suini selvatici permette di fare alcune considerazioni:

- il suino selvatico puo' fungere da serbatoio dell'infezione e da veicolo da Paese a Paese: la vicinanza dell'evento al confine con il Libano e la presenza di varchi naturali lungo tale confine, possono aver costituito un passaggio fondamentale per l'introduzione della malattia entro i confini del Paese. Da notare che mentre non esistono segnalazioni relative a PSC in Libano, esistono segnalazioni relative al passaggio di suini selvatici in Israele ed all'introduzione di *T. spiralis* (13,14).
- boschi e macchie di vegetazione circostanti l'allevamento possono costiture un rifugio abituale per i suini selvatici (Fig. 2)
- la tipologia dell'allevamento ed in particolare del reparto gestazione, costituito da un ampio capannone privo di recinzioni, provvisto di ampi accessi, con possibilita' di accesso diretto ai trogoli di alimentazione (Fig.16) induce ad ipotizzare l'ingresso di suini selvatici alla ricerca di cibo.

Il focolaio di PSC ha mostrato un andamento in due tempi: reparto gestazione e successivamente reparto sale parto e svezzamenti-ingrasso, a circa un mese di distanza. E' comunque difficile stabilire se si tratti di segni clinici:

- ad "esordio ritardato" (7) ed imputabili a soggetti (nel frattempo vaccinati) a lenta incubazione e spostati dalla zona gestazione alle sale parto
- a trasmissione del virus da parte del personale per "calo di attenzione" nelle misure di

profilassi diretta

- a trasmissione tramite aerosol (10) generati in occasione della pulizia a pressione operata nei reparti gestazione scrofe

La profilassi vaccinale scelta impone alcune riflessioni:

- la vaccinazione non e' stata in grado di prevenire completamente la malattia nei reparti dell'allevamento non coinvolti primariamente nel focolaio. Ancora, come gia' menzionato, difficile stabilire se trattasi di ridotta efficacia o di segni clinici ritardati in soggetti gia' infetti.
- Il vaccino utilizzato non consente una discriminazione tra soggetti vaccinati od infetti, cosi come suggerito dall'OIE (11)

Il riscontro di positivita' alla PSC in suini selvatici impone di considerare:

- l'eventuale profilassi vaccinale dei selvatici tramite vaccini orali (1, 11)
- la recinzione accurata dell'intero allevamento coinvolto e di tutti gli allevamenti della Regione in generale.

Bibliografia

1. Le Potier M.F., Mesplede A., Vannier P., (2006) "Classical Swine Fever and other Pestiviruses" in Diseases of Swine, 9 Ediz.Ames, Iowa, USA; Sraw B., Zimmerman J., D'Allaire S., Taylor D. Edit.; 309-322.
2. The Ministry of Agriculture and Rural Development, (2008), "Large Animals Slaughtering" in The Veterinary Services Yearly Report 2008" Bet Dagan, IL, 298-302
3. J.G. Songer; D. J. Taylor (2006) "Clostridial infections" in Diseases of swine; 9 Ediz. Ames, Iowa, USA; Sraw B., Zimmerman J., D'Allaire S., Taylor D. Edit.; 613-628
4. Straw B., Dewey C., Wilson M., (2006) "Differential diagnosis of disease" in Diseases of Swine, 9 Ediz.Ames, Iowa, USA; Sraw B., Zimmerman J., D'Allaire S., Taylor D. Edit.;241 - 286
5. de Smit AJ, Eble PL, de Kluijver EP, Bloemraad M, Bouma A. (2000) "Laboratory experience during the CSF experience in The Netherlands in 1997-1998" Vet Microbiol.; 73(2-3):197-208
6. Blome S., Meindl-Bohmer A., Loeffen W., Thuer B., Moennig V., (2006) ,, Assesment of CSF diagnostic and vaccine performance." Rev. Sci. Tech. 3:1025-1038
7. Scatozza F., Flammini C., (1998) "Flaviviridae" in Malattie Infettive degli Animali, 2nda Ediz. UTET, To, Scatozza & Flammini Edit., 709-744
8. Foglietto illustrativo internazionale "Pestiffa" (2009), Merial Asia Pte Ltd; Singapore
9. Dewulf J., Laevens H., Koenen F., Minties K., De Kruif A. (2004) "Efficacy of E2-sub-unit marker and C-strain vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus in weaned pigs". Preventive Veterinary Medicine, Vol. 65, (3-4): 121-133
10. Elbers A., Stegeman A., De Jong M., (2001), "Factorts associated with the introduction of CSF virus into pig herds in the central area of the 1997/98 epidemic in the Netherlands. Vet. Rec.149:377-382
11. OIE Terrestrial Manual, (2008)."Classical Swine Fever (hog cholera) Ch. 2.8.3:1092-1106
12. DEFRA report (2009) "Classical Swine Fever in Israel" Reference: VITT 1200/CSF-ISRAEL www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/monitoring/documents/csf-israel
13. Haim M, Efrat M, Wilson M, Schantz PM, D, Cohen D., Shemer J. (1997) "An outbreak of *Trichinella spiralis* infection in southern Lebanon". Epidemiol Infect. 119: 357-62.
14. Marva E., Markovics A., Gdalevich M., Asor N., Sadik C., Leventhal A. (2005) "Letter: Trichinellosis outbreak" in Emerging Infectious Diseases ,11-12:1979-1980 www.cdc.gov/eid

Tabelle e figure.

Tabella 1: dettaglio dei campioni esaminati per PSC e risultati positivi.
Table 1: detail of samples examined for CSF and samples resulted positive.

Origine	**ELISA Anticorpo**			**ELISA Antigene PSC**		**RT-PCR PSC**		**valore Ct**
Allevamento	*totale*	*positivi PSC*	*positivi BVD*	*totale*	*positivi*	*totale*	*positivi*	
sieri	24	12	0			7	7	22.33
omogenato d'organi				6	5 +vi 1 dubbio	6	5	28.96
omogenato di feto				1	1	1	1	23.37
Suini selvatici								
sieri	1	1				3	0	
omogenato d'organi				1	1	2	2	23.59

Figura 1: localizzazione del focolaio di PSC in Israele (12)
Figure 1: localization of CSF outbreak in Israel

Figura 2: localizzazione delle strutture dell'allevamento.
Figure 2: localization of farm's buildings

Figura 3: arrossamento della cute; decubito laterale. La scrofa in primo piano e' letterlamente "caduta" sulla compagna mentre tentava di allontanarsi barcollando.
Figure 3: red skin; lateral recumbency. The sow literally "fallen down" on another one while trying to get far away (from people observing)

Figura 4: cianosi cutanea
Figure 4: skin cyanosis

Figura 5: lesioni emorragiche sulla pleura parietale
Figure 5: emorragic lesions on parietal pleura

Figura 6: lesioni emorragiche epicardiche
Figure 6: hemorrhagic epicardic lesion

Figura 7: polmonite interstiziale con focolai emorragici
Figure 7: interstitial pneumonia with hemorrhagic foci

Figura 8: polmonite e pleurite fibrinosa
Figure 8: pneumonia and fibrinuous pleurisy

Figura 9: milza aumentata di volume.
Figure 9: enlarged spleen

Figura 10: linfonodi ingrossati ed emorragici
Figure 10: enlarged and hemorrhagic lymphnodes

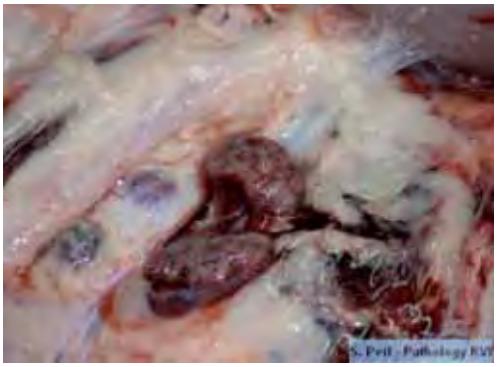


Figura 11: : linfonodi al taglio
Figure 11: lymphnodes at cutting surface

Figura 12: lesioni renali
Figure 12: kidney lesions

Figura 13: rene: emorragie corticali
Figure 13: kidney: hemorrhagic cortical lesions

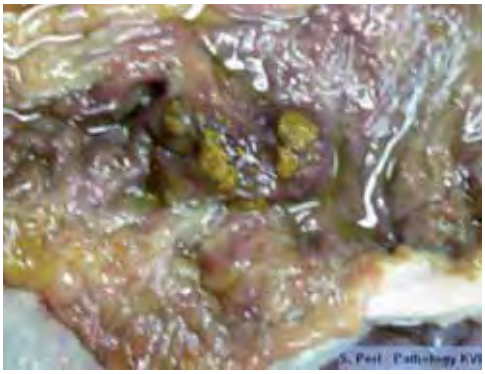
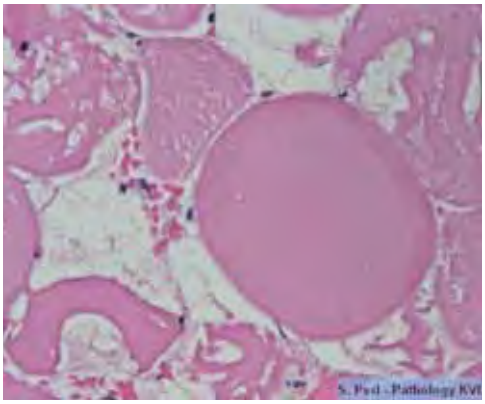


Figura 14: lesioni necrotiche nel piccolo intestino
Figure 14: necrotic lesions on small intestine



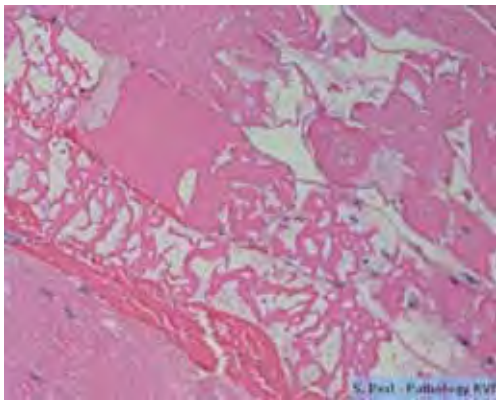


Figura 15: lesioni necrotiche alle miofibre; sezioni longitudinali e trasversali di muscolo
Figure 15: necrotic lesions to myofibers; longitudinal and transversal section of muscle

Figura 16: particolare del reparto gestazione: possibilita' di accesso alle mangiatoie
Figure 16: detail of pregnancy building, with possibility of access to troughs

PERSISTENZA DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI AUJESKY IN ALLEVAMENTO: ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO

AUJESZKY VIRUS PERSISTENCE IN PIG HERDS: RISK FACTORS ANALYSIS

VITALE N.[1], PITTI M.[1,4], VIARA S.[2], ORIGLIA S.[2], ROSSO F.[3], CHIAVACCI L.[1], MASOERO L.[1], SONA B.[2]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;
[2]Servizio Veterinario A.s.l. Cuneo1;
[3]Regione Piemonte, Sanità animale e igiene degli allevamenti
[4]V.S.A.-Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: Malattia d'Aujeszky, test sierologico, allevamento, fattore di rischio.
Key words: Aujeszky disease, serological test, herd, risk factor.

RIASSUNTO.
Questo lavoro descrive due anni di attività del programma regionale nei confronti della Malattia di Aujeszky applicato in Piemonte dal 2007 per implementare il piano di controllo nazionale. I risultati si soffermano sull'analisi dei fattori di rischio relativi alla permanenza del virus in allevamento individuati. Si dimostra che il controllo supplementare degli allevamenti limitrofi svolto in parallelo con i controlli del piano nazionale contribuisce sensibilmente a ridurre i livelli di sieroprevalenza regionali. I dati derivati da questa attività permettono di comprendere meglio l'epidemiologia della malattia di Aujeszky a livello regionale offrendo spunti molto utili per la sua eradicazione dal territorio.

ABSTRACT.
The paper reports two years of activity carried out in Piemonte region to implement the Aujeszky national control program at regional level. Results based on risk analysis demonstrate that the application of supplementary control measures in parallel with national ones is pivotal to reach further achievements in the eradication process. Data derived from this activity contribute to a better understanding of the epidemiology of Aujeszky disease at regional level and will be very helpful for the eradication process.

INTRODUZIONE.
La Malattia d'Aujeszky (MA), causata da Herpesvirus suis 1 (SuHV-1) è una patologia virale altamente contagiosa del suino. Il virus della MA (SuHV-1) ha un ampio spettro d'ospite: può colpire numerose specie animali sia domestiche sia selvatiche. Il suino si infetta prevalentemente per via oro-nasale, gli eventi patogenetici successivi dipendono dalla virulenza del ceppo virale, dall'età e dallo stato immunitario dell'animale (1). L'infezione virale causa encefalite e alta mortalità nei suinetti neonati e lattanti, malattie respiratorie nei soggetti all'ingrasso e turbe a carico dell'apparato riproduttivo nei suini adulti. Nell'ospite naturale l'infezione da SuHV-1 evolve costantemente nella latenza, il virus si localizza prevalentemente nelle cellule del sistema nervoso centrale; la riattivazione delle infezioni latenti comporta escrezione virale e favorisce la persistenza del virus a livello d'allevamento. (2)

La MA è stata diagnosticata per la prima volta in Italia nel 1940, è diventata poi endemica negli allevamenti intensivi della pianura padana. La presenza di questa patologia in allevamento è causa di rilevante danno economico; per questo motivo sono stati allestiti programmi per eradicare la malattia in vari paesi europei così da facilitare lo spostamento commerciale dei suini all'interno della Comunità Europea (3). I territori di molte nazioni dell'Europa centrale e settentrionale sono indenni. In Italia con il D.M. 1 agosto 1994 era stata istituita una campagna di profilassi volontaria, divenuta obbligatoria nel 1997. Il D.M. 1 aprile 1997 stabilisce l'obbligatorietà di un programma di controllo della malattia di Aujeszky tramite monitoraggio sierologico annuale, vaccinazione (vaccino deleto inattivato per i riproduttori, vaccino deleto inattivato o attenuato per i soggetti all'ingrasso) e predisposizione di adeguate misure di biosicurezza.
Tuttavia, in 10 anni di applicazione del piano nazionale, la prevalenza di allevamenti sieropositivi in Piemonte ha subito solo una lieve flessione attestandosi nel 2006 intorno al 36%. Al fine di ridurre a livelli sempre più bassi la prevalenza della malattia nel territorio regionale e riconoscere la qualifica sanitaria di "indenne" alle aziende in possesso dei requisiti richiesti dal piano, nel 2007 in Piemonte è stato attivato un Programma regionale di controllo ed eradicazione della MA ad adesione volontaria. Questo programma regionale non sostituisce il piano nazionale ma lo integra con misure e correttivi adeguati alla realtà territoriale piemontese.
Il piano nazionale prevede il controllo esclusivamente degli allevamenti da riproduzione (Ciclo Aperto e Ciclo Chiuso) con più di 6 riproduttori. In Piemonte gli allevamenti censiti complessivamente nel 2006 (riproduzione + ingrasso, compresi i familiari) sono stati 2.215. Le aziende controllate nello stesso anno in base al Piano Nazionale sono state 423, pari a circa il 19%.
Il programma regionale rispetto al D.M. 1 aprile 1997 propone l'adesione volontaria degli allevatori che intendono ottenere per il proprio allevamento la qualifica di "indenne", l'assistenza negli allevamenti problema (monitoraggio mediante suini sentinella), il controllo dei capi di nuova introduzione e degli allevamenti limitrofi. Attorno ad ogni azienda aderente al programma è stata istituita una "zona di attenzione" e tutti gli allevamenti suini presenti in tale area, indipendentemente dalla loro tipologia e dalle dimensioni (anche se solo da ingrasso o familiari), vengono sottoposti a controllo sierologico per MA. L'indagine è volta sia a verificare la situazione epidemiologica del territorio circostante l'azienda sia ad evidenziare eventuali irregolarità nell'esecuzione dei piani vaccinali da parte delle aziende vicine, quali l'omissione o la non corretta esecuzione della terza vaccinazione, obbligatoria nei soggetti all'ingrasso fra il 6° ed il 7° mese di età.
Nell'ambito del programma regionale prerogative per l'ottenimento della qualifica sono l'applicazione di adeguate misure di biosicurezza e la negatività sierologica a due prove consecutive a distanza di almeno 28 giorni e non oltre i novanta giorni.
Obiettivo del presente lavoro è presentare i risultati del piano regionale e la stima dei fattori di rischio relativi alla presenza di circolazione virale in allevamento.

MATERIALI E METODI.
Nel 2007 i veterinari ASL competenti per territorio hanno selezionato in tutto il Piemonte le aziende da inserire nel programma valutando la situazione aziendale. Sulle aziende aderenti è stato effettuato un primo prelievo di 60 campioni per allevamento per stimare la sieroprevalenza nei riproduttori. Contestualmente è stata compilata la scheda epidemiologica per raccogliere i dati relativi alle caratteristiche descrittivo-gestionali dell'allevamento e alle misure di biosicurezza adottate. Gli allevamenti suini di qualsiasi tipologia produttiva presenti in un raggio variabile da uno a cinque chilometri attorno ad ogni azienda aderente sono stati

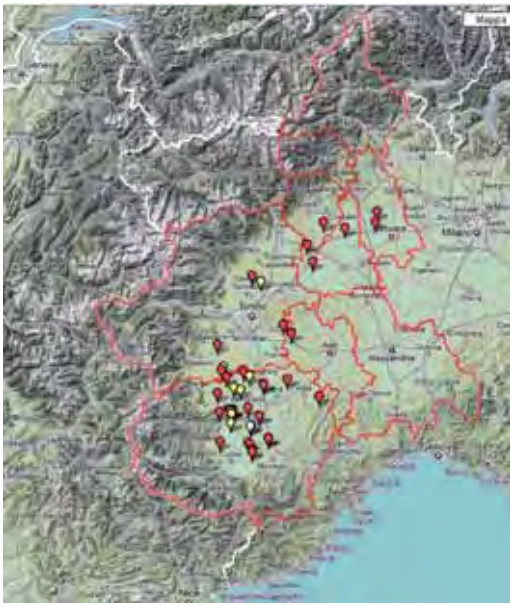
oggetto di controlli sierologici per verificare la presenza di sieropositività nei confronti della MA e per valutare l'efficacia della vaccinazione. Dopo sei mesi dall'attivazione del programma è stato effettuato un secondo controllo sierologico necessario per l'attribuzione della qualifica. Per valutare l'efficacia delle misure adottate è stato inoltre individuato, in ogni azienda, un gruppo di animali sentinella sieronegativi, costituito da 12 riproduttori (6 scrofette e 6 primipare). Per verificare l'eventuale circolazione virale nell'allevamento i capi sentinella sono stati sottoposti a controlli sierologici ogni 6 mesi fino al riscontro di due esiti negativi consecutivi.
Gli accertamenti sierologici sono stati effettuati dal Laboratorio di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino. I sieri sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-gE, glicoproteina dell'envelope del virus SuHV-1 utilizzando il kit HerdChek Anti-PRV-gpI® (IDEXX Laboratories), metodica ELISA competitiva.
I dati raccolti tramite la scheda epidemiologica e integrati con i risultati di laboratorio sono stati oggetto di un'analisi statistica descrittiva condotta sia a livello bivariato (test del chi quadro) sia multivariato (regressione logistica), al fine di investigare eventuali associazioni tra fattori di rischio e positività a livello aziendale con il software SAS 8.2 (4). I fattori analizzati, presenti sulla scheda epidemiologica, sono i seguenti:

- n°aziende nel raggio di 6km
- compravendita suinetti
- n°capi nel raggio di 6km
- geografia azienda
- pratica ingrasso
- pratica interruzione
- pratica lavaggi
- pratica magronaggio
- n° riproduttori
- n° fornitori
- n°ingrasso
- peso in ingresso
- peso alla macellazione
- peso scrofe
- rimonta
- sito azienda (centro abitato, isolato)
- aperto/chiuso
- tipo ventilazione
- vicinanza corsi acqua
- vicinanza vie comunicazione

Per quanto riguarda il tasso di positività per gli allevamenti aderenti al progetto, lo stato sanitario attuale è stato confrontato con quello antecedente l'adesione al programma regionale utilizzando i dati del progetto regionale 2008 e del piano nazionale 2006. Il confronto è stato eseguito utilizzando il test statistico McNamer.

RISULTATI.
Il programma regionale ha interessato complessivamente, nel corso dei tre anni di attività, 38 aziende da riproduzione: 33 scrofaie a "ciclo aperto", con vendita totale o parziale dei suinetti prodotti, quattro a "ciclo chiuso", un "centro verri", due "sito 2" (fase post-svezzamento) situate prevalentemente in un'area ad alta intensità zootecnica in provincia di Cuneo. Di queste, 30 aziende avevano aderito al piano nel 2007, 10 nel 2008 (Figura 1).

Figura 1. DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DEGLI ALLEVAMENTI ADERENTI (GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF ADHERENT HERDS)



Rosso: allevamenti aderenti nel 2007
(Red: adherent herds in 2007)
Giallo: allevamenti aderenti a partire dal 2008
(Yellow: adherent herds since 2008)
Bianco: allevamenti biologici
(White: organic farms)

Ad inizio progetto, nel gennaio 2007, nessuno dei 30 allevamenti selezionati aveva già acquisito in precedenza la qualifica di indenne: cinque risultavano sieropositivi, tre erano sieronegativi ad un controllo con campionamento statisticamente significativo ma erano senza qualifica, 22 erano stati controllati esclusivamente con le modalità previste dal piano di controllo nazionale (12 campioni all'anno) per cui il loro reale stato sanitario era sconosciuto (5). In tabella 1 sono riportate le qualifiche degli allevamenti aderenti a dicembre 2007 e dicembre 2008. La maggior parte delle aziende aderenti è situata nella provincia di Cuneo (28/40; 70%) area a maggior densità zootecnica della regione. L'analisi statistica bivariata ha evidenziato un'associazione tra lo stato sanitario dell'allevamento e i seguenti fattori: tipologia riproduttiva (LRT=5.01 $p<0.02$), aziende nel raggio dei 6 km (LRT=8.20 $p<0.004$), ventilazione (LRT=3.86 $p<0.04$). I fattori risultati significativi a livello bivariato sono stati inseriti in un modello di regressione logistica. Il modello migliore è risultato quello con due fattori: aziende nel raggio di 6 Km e tipologia produttiva. Il fattore ventilazione è risultato colineare con la tipologia produttiva. Avere più di 5 aziende nel raggio di 6 km aumenta la probabilità di essere positivo di quasi 9 volte (OR=9.3; IC95%: 1.8-47.6). La tipologia produttiva ciclo aperto aumenta la probabilità di essere positivo di quasi 8 volte (OR=8; IC95%: 1.3-50).
In totale sono stati controllati 193 allevamenti "limitrofi": 68 (35.23%) di queste aziende sono risultate positive e 125 (64.77%) negative.

Tabella 1 QUALIFICHE AZIENDE PER ANNO (HERD STATUS PER YEAR)

Anno (year)	Aziende indenni (free herds)	%	Aziende positive (positive herds)	%	Totale aziende (total number of herds)
2007	21	70,0%	9	30,0%	30
2008	30	75,0%	10	25,0%	40

Sulle 30 aziende aderenti al progetto dal 2007 il test McNamer è risultato statisticamente significativo (X^2= 4; p<0.04), il tasso di positività dal 2007 al 2008 è calato dal 31% al 17% e la differenza è statisticamente significativa. Sulle 40 aziende aderenti al progetto nel 2008 Il tasso di positività è del 26.3%; confrontando i dati del piano nazionale la positività in queste stesse aziende nel 2006 era del 42.1%, la differenza non è tuttavia statisticamente significativa (X^2= 3; p<0.08). Cinque allevamenti aderenti al progetto sieronegativi ai controlli del piano nazionale effettuati su 12 capi sono risultati in realtà sieropositivi al controllo dei 59 capi previsti dal progetto regionale.

CONCLUSIONI

Nell'ambito del progetto regionale sono state controllate rispettivamente 30 aziende da riproduzione e 74 aziende limitrofe nel 2007 e 40 aziende da riproduzione e 193 aziende limitrofe nel 2008. La sieroprevalenza nelle aziende limitrofe, per lo più a tipologia produttiva ingrasso, è risultata essere del 35% in linea con la prevalenza registrata dal piano nazionale.
La sieroprevalenza sul campione di 30 allevamenti comune ai due anni di progetto è passata dal 31% al 17% e questa differenza è statisticamente significativa; considerando invece i due anni separatamente: nel 2007 la sieroprevalenza era del 30% e nel 2008 del 25%. Considerando gli indirizzi produttivi, la sieroprevalenza è diminuita dal 23.1% al 7,69% negli allevamenti da riproduzione a ciclo aperto, mentre è rimasta sostanzialmente invariata in quelli a ciclo chiuso (2%).
Per quanto riguarda l'analisi sui fattori di rischio si è osservata un'associazione significativa tra stato sierologico e ciclo produttivo, infatti gli allevamenti a ciclo aperto hanno mostrato un rischio di sieropositività superiore rispetto a quelli a ciclo chiuso. Questo dato è in linea con quanto riportato da altri autori (6,7). Oltre al ciclo produttivo, è stato identificato quale fattore di rischio il numero di allevamenti suini nel raggio di 6 Km. Questo dato individua come sia importante, nell'ambito di un piano di controllo ed eradicazione per MA, il controllo degli allevamenti limitrofi. Questa misura può essere considerata un punto di forza del progetto regionale e può contribuire alla riduzione della sieroprevalenza nell'ambito del piano nazionale. Un altro punto critico nel controllo della MA è la dimensione del campione di suini da testare sierologicamente. Il piano nazionale prevede il controllo di 12 capi numero sufficiente ad evidenziare una prevalenza intrallevamento della MA attorno al 22%, la dimensione campionaria prevista dal progetto regionale è di 59 capi, ampiezza sufficiente ad evidenziare una prevalenza intrallevamento del 5%. Dopo quasi 10 anni di vaccinazionazione la situazione epidemiologica nei confronti di MA è mutata e un campionamento di almeno 59 capi per la realtà piemontese sembra più adeguato per verificare lo stato sanitario degli allevamenti suini.

BIBLIOGRAFIA.

1. Sawitzky D. (1997) "Transmission, species specificity, and pathogenicity of Aujeszky's disease virus". Arch Virol Suppl. 13, 201-206.
2. Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Vicente J., Gortazar C. (2007) " Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar". Vet Microbiol. 120, 241-250.
3. Boelaert F., Deluykerb H., Maesb D., Godfroid J., Raskinc A., Varewijckc H., Pensaertb M., Nauwynckb H., Castryckd F., Miryd C., Robijnsd J.M., Hoetd B., Segersd E., Van Vlaenderen I., Robert A., Koenena F. (1999) "Prevalence of herds with young sows seropositive to pseudorabies (Aujeszky's disease) in northern Belgium". Prev Vet Med. 41, 239-255.
4. SAS Institute Inc. (1999) "SAS/STAT User's Guide", Version 8, SAS Institute, Cary, NC, USA.
5. Sona B., Origlia S., Viara S., Masoero L. (2008) "Aujeszky 2007: attività di controllo ed eradicazione della pseudorabbia in allevamenti suini nella Regione Piemonte". Medicina Veterinaria Preventiva 29, 1822.
6. Tamba M., Calabrese R., Finelli E., Cordioli P. (2002) "Risk factors for Aujeszky's-disease seropositivity of swine herds of a region of northern Italy". Prev Vet Med. 54, 203-212.
7. 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". XXVIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, Piacenza, 14-15 marzo 2002, 251-263.

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

INDAGINE IN CAMPO SULLA DIFFUSIONE DELLA CISTITE DELLA SCROFA

FIELD SURVEY ON THE DISTRIBUTION OF SOWS CYSTITIS

GRATTAROLA C.[1], BELLINO C.[2], BOTTA E.[3], DONDO A.[1], MAGGI E.[2], MASSA M.[3], MONDINO S.[4], TURSI M.[2], VARNAVA' D.[5], CAGNASSO A.[2]

[1] I.Z.S. Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino;
[2] Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino;
[3] Medico Veterinario Libero Professionista, Torino, Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN), Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino;
[4] Medico Veterinario dipendente ASL CN1;
[5] Medico Veterinario Libero Professionista, Torino;

PAROLE CHIAVE: Cistite, Scrofa, Macello, Esame Istologico
KEYWORDS: Cystitis, Sow, Slaughterhouse, Histological Exam

RIASSUNTO
Il seguente studio si propone di valutare l'incidenza della patologia in scrofe riformate provenienti da diversi allevamenti siti in provincia di Cuneo e di Torino. Le indagini sono state condotte su 72 scrofe a fine carriera regolarmente macellate alle quali in sede di macellazione sono stati prelevati vescica, uretra e reni. L'esame anatomo patologico ha permesso di evidenziare un'incidenza della cistite pari a circa il 46%.

ABSTRACT
The following study aims to assess the incidence of the disease in reformed sows from different farms sites in the province of Cuneo and Turin. The surveys were conducted on 72 sows in late career regular slaughtered and during the slaughter were collected bladder, urethra and kidneys. The anatomopathological examination has brought to light an incidence of cystitis equal to 46%.

INTRODUZIONE

La cistite è un processo infiammatorio della vescica che può originare da molteplici cause. Nell'apparato urinario sono normalmente in atto numerosi meccanismi di difesa che mirano a mantenere l'equilibrio tra l'animale ed i microrganismi che compongono la flora microbica locale come le caratteristiche della mucosa vescicale, l'unidirezionalità del flusso urinario, il pH urinario e la secrezione di anticorpi a livello mucosale (IgA).
Nel suino, una causa predisponente allo sviluppo di cistiti può essere considerata la caratteristica basicità del pH urinario, che limita il controllo dello sviluppo microbico, e che comporta, a scopo correttivo, la somministrazione di acidificanti (Xaver T. P. Glock *et al.,* 2005).

Il susseguirsi di situazioni che comportano stress cronico, con conseguente aumento dei tassi di cortisolo e induzione di immunodepressione, o la gravidanza, con particolare riferimento al periodo del periparto, in cui si ha una riduzione della risposta cellulo-mediata, favoriscono la colonizzazione delle vie urinarie da parte dei microrganismi; discontinuità dell'epitelio mucosale dovute, ad esempio, alla presenza di calcoli vescicali limitano ulteriormente la resistenza alla colonizzazione batterica.
Le modalità attraverso cui i suini possono acquisire infezioni all'apparato urinario sono due: ascendente e discendente. Con la prima, la più frequente, i batteri raggiungono la vescica partendo dall'ambiente esterno o dall'apparato riproduttore, la seconda, invece, più rara, si verifica quando l'animale è in stato di batteriemia.
Ogni alterazione dell'equilibrio dell'apparato urinario è dunque un fattore di rischio per la salute del suino e può condurre allo sviluppo di batteri patogeni, ma anche di batteri opportunisti e commensali, i quali, sfruttando il calo delle difese locali, riescono ad invadere i tessuti e a causare flogosi.
Le scrofe dal quarto parto in poi sono quelle in cui più frequentemente si osserva la patologia, spesso a decorso asintomatico, svelata solitamente come reperto occasionale al macello o nel corso di necroscopie.
Le scrofe più vecchie presentano spesso problematiche legate all'apparato locomotore, indotte dalle caratteristiche del pavimento grigliato su cui risiedono, dalla limitazione di movimenti nelle gabbie parto, dall'aumento eccessivo di peso in gravidanza, tutti fattori che nell'insieme comportano un'esposizione costante a microtraumi, fino all'insorgere di zoppie; di conseguenza, gli animali si alzano meno frequentemente per urinare, alterando il regolare meccanismo del flushing, e tendono, in alcuni casi, a urinare in decubito, facilitando il ristagno di urina in vagina, favorendo così ulteriormente le proliferazioni batteriche (Madeleine Chagnon, *et al*., 1991; Sylvie D' Allaire *et al*., 1991).
Alcuni autori identificano nel periodo del periparto il periodo più critico per questa patologia, perché oltre allo stress dell'evento e all'inizio della lattazione, si aggiunge anche un cambiamento qualitativo della flora microbica vaginale (Y. Sasaki *et al.,* 2008; C. O. Duran, 2001). Altri autori identificano invece come periodo più problematico quello della lattazione perchè le fattrici utilizzano la maggior parte dei liquidi introdotti per la produzione lattea, pertanto la quantità di urina che questi animali producono è inferiore al normale, urinano con meno frequenza e da qui si innescano nuovamente i meccanismi per l'instaurarsi della patologia (Glen Almond, 2005; G. W. Almond *et al*., 2006).
Fondamentale, per il controllo delle cistiti, è la gestione dell'allevamento: è essenziale che gli animali abbiano la possibilità di abbeverarsi ogni qualvolta sia necessario, per non concentrare eccessivamente le urine, e l'igiene e la pulizia delle gabbie parto non deve essere carente, perchè le feci rappresentano una delle maggiori fonti di contaminazione dell'apparato uro-genitale (N. Abiven *et al.,* 1998; G. W. Almond *et al.,* 2006).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato realizzato con la collaborazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e del Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, con l'obiettivo di determinare la prevalenza delle affezioni urinarie della scrofa, di studiare la flora batterica responsabile delle infezioni del tratto urinario e di valutare l'efficacia delle indagini collaterali (microbiologiche e biochimiche) per diagnosticare la patologia in vita.
Le indagini sono state condotte su 72 scrofe a fine carriera regolarmente macellate in uno stabilimento piemontese e provenienti da allevamenti della provincia di Cuneo e di Torino.

Da ogni animale macellato sono stati prelevati, al momento dell'eviscerazione, i seguenti organi: vescica, uretra, reni; per evitare contaminazioni esterne dell'urina, le vesciche venivano prontamente chiuse mediante legatura del collo. Gli organi raccolti venivano portati alla Sezione di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino. Da ogni vescica è stata prelevata asetticamente l'urina mediante cistocentesi, l'urina veniva poi suddivisa in 2 aliquote destinate al laboratorio, una per l'esame batteriologico ed una per l'esame biochimico. In seguito, le vesciche venivano aperte e sottoposte all'esame anatomo-patologico macroscopico. Da ogni vescica è stata prelevata una sezione della parete a pieno spessore che è stata fissata in formalina al 10% per il successivo esame istologico. Analogamente, per ogni animale, sono stati fissati in formalina al 10% sezioni di uretra e di rene.
A causa dell'assenza di urina in alcune vesciche, le indagini fisico-chimiche e batteriologiche sono state eseguite rispettivamente solo su 66 e 67 campioni.
Esame istologico:
i campioni sono stati fissati in formalina al 10% e sottoposti alle procedure standard di inclusione in paraffina. Si è poi proceduto al taglio microtomico con sezioni seriali di 3 μm, sottoposte a colorazione con Ematossilina-Eosina. I preparati istologici sono stati esaminati attentamente nell'intera sezione ad ingrandimento 40X.
Esame fisico-chimico:
l'urina di ogni capo è stata posta in provette con un volume pari a 9ml; sono stati valutati i caratteri macroscopici (colore e aspetto) e successivamente, con l'ausilio di cartine multistix, è stata rilevata la presenza di glucosio, bilirubina, corpi chetonici, sangue, proteine, leucociti, RBCs, WBCs, urobilinogeno, nitriti, e il pH; la densità è stata valutata con un rifrattometro.
In seguito, le provette sono state centrifugate per 5 minuti a 1500 giri per permettere l'analisi microscopica del sedimento; il riscontro di anomalie, in alcuni casi, ha reso opportuna l'esecuzione del citocentrifugato, con apposizione di 100μl di urina su di un vetrino, centrifugazione per 5 minuti a 1500 giri e osservazione del vetrino al microscopio, previa colorazione.
Esame batteriologico:
l'esame colturale è stato allestito eseguendo contemporaneamente due tipi di indagine, quantitativa (calcolo della carica batterica aerobica totale) e qualitativa.
Per la determinazione della carica batterica aerobica totale per ml (CBT/ml) si è provveduto a diluire ogni campione di urina in proporzione 1:100 (prelevando 0,1 ml di urina, preventivamente vortexata, e trasferendola in 9,9 ml di soluzione fisiologica sterile); 0,1 ml di tale diluizione è stato distribuito uniformemente su una piastra di Columbia Blood agar con l'ausilio di una spatola sterile, e la piastra è stata incubata a 37°C per 24 h. E'stato quindi eseguito il conteggio delle colonie sviluppatesi e, tenendo conto del fattore di diluizione 1:100 e della quantità seminata (0,1 ml), moltiplicando il numero di colonie per 1000 è stata calcolata la carica batterica/ml (ufc/ml); la carica batterica è stata considerata significativa in presenza di valori $>10^5$ ufc/ml, di dubbia interpretazione con valori compresi tra 10^5 e 10^4 ufc/ml, mentre valori inferiori a 10^4 ufc/ml non sono stati considerati significativi.
La semina di ogni campione, per l'esame qualitativo, è stata eseguita per dispersione su 3 piastre di Columbia Blood agar e una piastra di Mac Conkey agar, immergendo un tampone sterile nel campione di urina, precedentemente vortexato, e seminando il primo quadrante della piastra, utilizzando un secondo tampone sterile per la semina dei restanti quadranti. Una piastra di Columbia Blood agar e la piastra di Mac Conkey agar sono state incubate aerobicamente a 37°C per 24 h. Le restanti piastre di Columbia Blood

agar sono state incubate, rispettivamente, in atmosfera arricchita (5% CO_2), a 37°C, per 24-48h, e in anaerobiosi, in giara, a 37°C, per 48-120 h.
Si è provveduto all'identificazione delle specie batteriche cresciute in aerobiosi in coltura pura o in numero di colonie >20 per piastra, laddove la CBT/ml risultava $>10^5$ ufc/ml o compresa tra 10^4 e 10^5 ufc/ml; si è proceduto ad identificazione anche in caso di analoga crescita associata a CBT $<10^4$ ufc/ml, trattandosi di esami condotti su urina prelevata in asepsi (cistocentesi); per la crescita in microaerofilia (CO_2 al 5%) e in anaerobiosi si è proceduto all'identificazione delle colonie macroscopicamente non assimilabili a quelle sviluppatesi in condizioni di aerobiosi.
L'identificazione dei ceppi batterici è stata condotta con l'ausilio di gallerie API miniaturizzate o con sequenziamento della sequenza del gene 16SrRNA con Microseq500[å], in casi di difficile interpretazione e in caso di sospetta presenza di Actinobaculum suis (riscontro, in anaerobiosi, di colonie di 0,5-3 mm di diametro dopo 48h, circolari, con margini interamente o parzialmente irregolari, granulose, non emolitiche).
Per la valutazione della positività all'esame batteriologico sono stati considerati in parallelo il valore della carica batterica aerobica totale, le tipologie di microrganismi isolati e le relative condizioni di crescita (es. isolamento esclusivo in microaerofilia o anaerobiosi) . I campioni che presentavano crescita batterica non significativa (CBT$< 10^4$, con crescita di flora mista o in numero di colonie < 20 per piastra) o sterili sono stati considerati negativi.

RISULTATI

Qui di seguito sono riportati gli esiti degli esami eseguiti sull'urina delle scrofe a fine carriera e sui preparati istologici di origine vescicale ed uretrale provenienti dai medesimi animali.
I campioni istologici relativi a vescica e ad uretra sono stati suddivisi in 6 gruppi a seconda della gravità e della diffusione del processo flogistico rilevato, ovvero diffusa-grave cistite linfo-plasma cellulare, diffusa-moderata cistite linfo-plasma cellulare, diffusa-minima cistite linfo-plasma cellulare, multifocale-moderata cistite linfo-plasma cellulare, multifocale-minima cistite linfo-plasma cellulare e assenza di lesioni.
Dei parametri ottenuti a seguito dell'analisi fisico-chimica e del sedimento sono stati presi in considerazione la proteinuria, il pH (media ± dev.stand), la presenza di leucociti, di cellule epiteliali e di eritrociti.
Per quanto concerne l'esame batteriologico, oltre all'indicazione relativa alla positività o meno del campione, è riportata la specie batterica rilevata.

VESCICA	N° campioni	BATT. POSITIVO	MICRORGANISMO ISOLATO	BATT. NEGATIVO	PROTEINURIA batt +	PROTEINURIA batt -	pH (media) batt +	pH (media) batt -	LEUCOCITI presenti al batt.+	LEUCOCITI presenti al batt. -	cellule epiteliali presenti al batt. +	cellule epiteliali presenti al batt. -	RBC presenti al batt.+	RBC presenti al batt. -
Diffusa, grave cistite linfo-plasma cellulare	8 (2)	3	E. coli 2; Helcococcus Kunzii 1	5	3		8± 1,3	6,7± 0,8	3	1	3	3	3	2
Diffusa,moderata cistite linfo-plasma cellulare	10	5	E.coli 2; Staphylococcus hycus1; Staphylococcus saprophyticus 1; Staphylococcus aureus 1	5		1	6,8± 0,3	6,6± 0,4	4	3	5	5	1	3
Diffusa, minima cistite linfo-plasma cellulare	11 (2)	3	E.coli 1; Enterococcus faecalis, Proteus, E.coli 1; Streptococcus alactoluticus, Campylobacter coli 1	6	1		6,5± 0,0	6,8± 0,7	3	3	2	6	2	4
Multifocale, moderata cistite linfo-plasma cellulare	4	2	E. coli 2	2	1	1	6,5± 0,7	7± 0,6	2	2	2	2	1	2
Multifocale, minima cistite linfo-plasma cellulare	6	2	E.coli1; Streptococcus spp. 1	4	1	1	7± 0,7	6,5± 0,07	2	2	2	2	1	1
Assenza di lesioni	33 (1)	7	E.coli 2; Staphylococcus aureus 1; Enterococcus Faecalis 3; Aeromonas Hidrophyla 1	25	4	2	6,6± 0,5	6,8± 0,5	6	8	5	21	6	8

( )= n° di campioni con esami incompleti.
( )= No. of samples with incomplete examinations.
Tab. 1: Tabella riepilogativa degli esami eseguiti.
Tab. 1: Summary table of the tests.

La percentuale di vesciche risultate affette da cistite in base all'esame istologico è risultata pari al 45,8% contro il 54,2% di vesciche risultate sane.

Tab. 2: Uretra: esame istologico.
Tab.2: Urethra: histological examination.

URETRA	N° campioni	
Diffusa, moderata uretrite linfo-plasma cellulare	17	
Diffusa, minima uretrite linfo-plasma cellualre	10	
Multifocale, moderata uretrite linfo.plasma cellulare	1	
Multifocale, minima uretrite linfo-plasma cellulare	7	
Focale, grave uretrite linfo.plasma cellulare	1	
Assenza di lesioni	23	
	59	Di 13 campioni manca il referto istologico relativo all'uretra.

La percentuale di uretre risultate affette da uretrite in base all'esame istologico è risultata pari al 61% contro il 39% di uretre risultate sane.

Campioni positivi	N°(%)	microrganismo	N° isolati per genere
Per 1 specie batterica	20 (90%)	*Escherichia coli*	*Escherichia* spp: 10
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Escherichia coli	
		Staphylococus hycus	*Staphylococcus* spp: 4
		Staphylococcus saprophyticus	
		Staphylococcus aureus	
		Staphylococcus aureus	
		Enterococcus faecalis	*Enterococcus* spp: 3
		Enterococcus faecalis	
		Enterococcus faecalis	
		Streptococcus bovis II	*Streptococcus* spp: 1
		Helcococcus kunzii	*Helcococcus* spp: 1
		Aeromonas hidrophyla	*Aerococcus* spp:1
Per 2 specie batteriche	1(5%)	*Streptococcus spp, Campylobacter coli*	
Per più di due specie batteriche	1(5%)	*Escherichia coli, Enterococus faecalis, Proteus spp*	
Totale	22		

Tab.3: Esami batteriologici positivi.
Tab.3: Bacteriological tests positive.

Per quanto concerne la localizzazione delle lesioni osservate mediante l'esame istologico, si sono prese in considerazione le alterazioni che hanno coinvolto il tratto inferiore dell'apparato urinario e quindi la vescica e l'uretra; si è così osservata una maggiore prevalenza di processi infiammatori che coinvolgono contemporaneamente i due organi rispetto a quelli che coinvolgono i due organi singolarmente e precisamente nel 5% dei casi si sono riscontrate lesioni alla vescica, nel 33% all'uretra e nel 62% le lesioni sono localizzate in entrambe.

Graf.1: Localizzazione delle lesioni istologiche osservate.
Graph. 1: Localization of histological lesions observed.

A titolo esemplificativo vengono di seguito riportate due fotografie relative rispettivamente ad una vescica con mucosa normale e ad una vescica con un grave processo flogistico in atto; la vescica della seconda fotografia presenta una grave cistite emorragica, l'esame del sedimento ha rivelato batteri, leucociti ed ematuria, proteine all'esame fisico-chimico ed E. coli all'esame batteriologico.

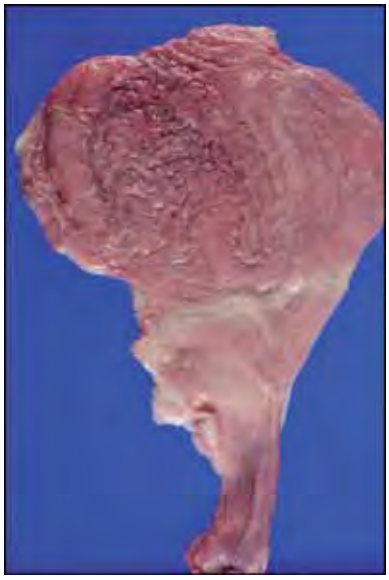


Foto 1: vescica normale
Pict 1: Normal bladder

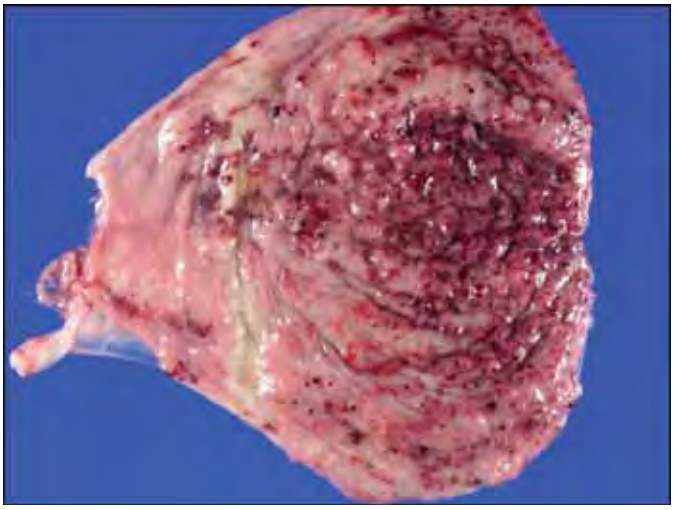


Foto 2: grave cistite emorragica: esame batteriologico delle urine positivo per E.Coli . L'esame del sedimento ha rivelato batteri, leucociti ed ematuria. Proteine all'esame fisico-chimico.
Pict 2: Severe hemorrhagic cystitis: presence of E.coli in bacteriology. Examination of the sediment revealed bacteria, leukocytes, and haematuria. Protein at the chemical physical examination.

DISCUSSIONE - CONCLUSIONI

Dallo studio si evince che sono molte le scrofe a fine carriera con cistite: all'istologico, la percentuale di vesciche affette dalla patologia è risultata del 45,8%. Questi sono animali sottoposti a stress cronico, tra cui la gravidanza, evento che favorisce, insieme ad altri, la colonizzazione delle vie urinarie da parte dei batteri. In particolare, i 22 casi risultati positivi al batteriologico hanno visto come protagonisti della colonizzazione E.coli, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus bovis II, Helcococcus kunzii, Aeromonas hidrophyla, Streptococcus spp., Campylobacter coli, Proteus spp., che hanno portato o singolarmente, o in associazione, l'infezione. E' frequente il riscontro di uretrite all'esame istologico (61% dei casi): questo conferma il fatto che è molto più probabile un'infezione ascendente rispetto alla discendente causata da batteriemia. Una non corretta gestione e pulizia delle strutture, con conseguente accumulo di feci, può predisporre alla colonizzazione delle vie urinarie per via ascendente da parte di E.coli: in 10 casi risultati positivi su 22, gli esami hanno rilevato la presenza del batterio come unica specie causa di cistite. In vita non esiste un test diagnostico sicuro per rilevare la cistite, ed è per questo che è molto importante valutare più paramentri, tra cui la proteinuria, le cellule epiteliali, i leucociti e i globuli rossi. Per quanto riguarda il pH, sebbene in letteratura si possa leggere che la basicità di questo può essere una causa predisponente della patologia, non sembra un parametro significativo per la diagnosi. Diventa importante correlare molti parametri tra loro, facendo riferimento soprattutto all'esame del sedimento per valutare wbc, rbc, cellule epiteliali, batteri intracellulari: in diversi casi ha svelato la presenza di questi parametri che non erano stati rilevati dal semplice esame delle urine con le cartine multistix.

BIBLIOGRAFIA

Madeleine Chagnon, Sylvie D' Allaire and Richard Drolet (1991) "A prospective study of sow mortality in breeding herds." Can J Vet Res 1991; 55, 180-184

Y. Sasaki and Y. Koketsu (2008) "Mortality, death interval, survivals and herd factors for death in gilts and sows in commercial breeding herds." J. Anim. Sci. 2008. 86, 3159-3165

Glen Almond (2005) "An assessement of urinary tract infection in sows."

N. Abiven, H. Seegers, F. Beaudeau, A. Laval and C. Fourichon (1998) "Risk factors for high sow mortality in French swine herds." Preventive Veterinary Medicine 33 (1998) 109-119

Xaver T. P. Glock, Gabor Bilkei (2005) "The effect of postparturient urogenital diseases on the lifetime reproductive performance of sows." Can Vet J 46, December 2005

G. W. Almond, L. G. Simpson, M. S. Nemechek, P. A. Routh (2006) "Urine abnormalities in lactating sows." Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenaghen, Denmark, 2006 Vol. I

Euzéby, J.P. : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Actinobaculum, Actinobaculum suis

http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/actinobaculum.html Accessed november 26/2008

Porcine Cystitis-pyelonephritis Complex
http://merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/130303.htm Accessed november 21/2008
© 2008; Merck & Co., Inc.Whitehouse Station, NJ USA

LAWSON (P.A.), FALSEN (E.), ÅKERVALL (E.), VANDAMME (P.) et COLLINS (M.D.) (1997) Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 899-903.

LIEBHOLD (M.), WENDT (M.), KAUP (F.J.) et DROMMER (W.) (1995)Clinical, and light and electron microscopical findings in sows with cystitis. *Vet. Rec.*, 137, 141-144.

WALKER (R.L.) et MACLACHLAN (N.J.) (1989) Isolation of *Eubacterium suis* from sows with cystitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195, 1104-1107.

Groehs Goldberg A.M.(2007) Manual de urinalise suina!da coleta a analise dos resultados-Universidade federal do rio grande do sul , Porto Alegre

NOVARTIS
ANIMAL HEALTH

Curiamo i vostri animali al meglio **perchè rendano al massimo.**

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali. Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari in grado di combattere le più importanti patologie degli animali da reddito ed assicurare loro un ambiente di vita più salubre.
Animali in buona salute, più rilassati, producono di più e meglio, grazie alle soluzioni terapeutiche d'avanguardia di Novartis Animal Health, sviluppate nel rispetto dei più rigidi standard di eccellenza qualitativa per garantire efficacia, tollerabilità, sicurezza. E massima resa.

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

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE CISTITI SUBCLINICHE NELLE SCROFETTE AL MACELLO

SUBLINICAL CYSTITIS IN YOUNG SOWS: A PRELIMINARY STUDY

APICELLA M.[1], OSELLA E. [1], GAMBINO F. [1], ALBORALI L. [2], ZANONI M.G. [2], SALOGNI C. [2], BOLLO E. [3], GUARDA F. [3, 4]

[1]Regione Piemonte, ASL CN1, Saluzzo (CN); [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia; [3]Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO); [4]Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Grugliasco, (TO).

Parole chiave: scrofa, vescica, cistite
Key words: sow, bladder, cystitis

RIASSUNTO
Gli autori hanno condotto uno studio sulla patologia della vescica, esaminando 594 vesciche di scrofette macellate, dell'età di 9 mesi e del peso di 150-170 kg e sottoponendo 69 campioni di urina a esame batteriologico. In 50 (8,1%) campioni sono state rilevati focolai infiammatori e ulcere, in 20 (3,4%) campioni catarro, uroliti e sedimenti, e in 43 (62,3%) campioni di urina sono stati isolate diverse specie di batteri (*E. coli*:, *Staphylococcus* sp*., Streptococcus* sp*., Serratia* sp*., Proteus* sp*.)*.
L'istopatogenesi delle alterazioni sembra essere piuttosto semplice, secondo le fasi caratteristiche della flogosi, mentre non sono ancora del tutto chiari i fattori eziologici responsabili delle lesioni riscontrate. Scadenti condizioni di igiene ambientale, fattori stressogeni e accoppiamenti nei box potrebbero essere responsabili della risalita dei patogeni lungo il tratto genito-urinario.

ABSTRACT
The authors have examined 594 urinary bladders of young sows aged 9 months and weighing 150-170 kg, and 69 urine samples for bacterial isolation. In 50 (8,1%) of the urinary bladder, inflammatory foci and ulcers were detected, in 20 (3,4%) samples catarrhal material, uroliths and sediments, and in 43 (62,3%) samples several bacterial species were isolated (*E. coli*, *Staphylococcus* sp*., Streptococcus* sp*., Serratia* sp*., Proteus* sp.). The histopathogenesis of the lesions follows the characteristic stages of the inflammatory process, while the etiological factors responsible for the lesions are not yet fully elucidated. Poor environmental conditions, stressors and the coitus may be responsible for ascending infections of the urinary tract.

INTRODUZIONE
La vescica urinaria, per topografia e funzioni, può essere considerata la sede ottimale per osservazioni ed esami volti a rilevare patologie occulte a carico dell'apparato urinario, sia di tipo ascendente che discendente. E' altresì noto che le infezioni anche banali del tratto urinario possono rappresentare un fattore comune di infertilità delle scrofe, mentre forme più gravi (quali pielonefriti) possono condurre a una fine precoce della carriera riproduttiva e talvolta a morte in un numero significativo di scrofe. Secondo Häni *et al.* (1976) le infezioni del tratto urinario rappresentano infatti una delle principali cause di mortalità nei suini al di sopra di un anno di età, con percentuali nella scrofa variabili dal 7% al 29% (Carr *et al*., 1995).

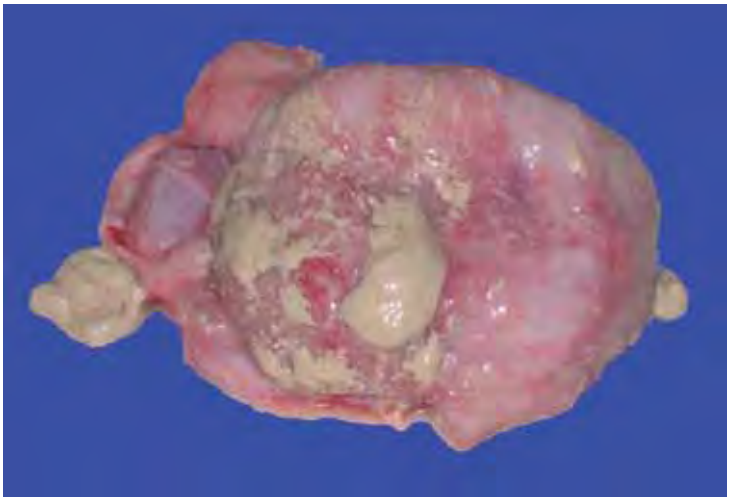


Fig. 1 – Vescica con sedimento di residui purinici.

La diagnosi clinica in allevamento difficilmente può essere tempestiva, poiché la patogenesi delle affezioni del tratto urinario esprimerebbe una sintomatologia conclamata solo in presenza di un grave deficit funzionale (Berner, 1988; Stirnimann, 1984); infatti è possibile osservare al macello nefriti, glomerulo-nefriti e cistiti talvolta gravi, provenienti da soggetti che alla visita *ante-mortem* non presentavano alcun sintomo di sofferenza o malessere.
Alcuni studi hanno identificato le principali condizioni che possono favorire l'insorgenza di cistiti nella scrofa, rappresentate dal coito (anche in considerazione che, all'ingrasso, la presenza di criptorchidi, stimata pari allo 0,7%, determina numerosi accoppiamenti nei box misti), insufficiente assunzione di acqua, minzione irregolare o insufficiente e/o incompleto svuotamento della vescica, e pH urinario elevato (Bollwahn e Amhofer, 1989; Maes *et al*., 2004).
Tra gli agenti patogeni più frequentemente coinvolti nelle affezioni del tratto urinario sono stati segnalati batteri (quali salmonelle, streptococchi anaerobi, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Klebsiella*, e soprattutto *Eubacterium suis*) e virus (quali il virus della peste suina classica e africana) (Fairbrother, 2006).
A seguito di tali considerazioni è stato identificato il macello quale osservatorio privilegiato, in grado di fornire le informazioni di carattere anatomo-patologico ed epidemiologico nonché i campioni necessari per gli approfondimenti istopatologici e microbiologici, focalizzando l'attenzione sulle vesciche urinarie delle giovani scrofe.
Si vuole altresì sottolineare che il presente studio deriva dalla collaborazione continuativa e consolidata negli anni tra istituzioni diverse e in particolare: Servizio Veterinario ASL CN1 di Saluzzo (area B) per la raccolta dei campioni; Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino per il coordinamento e le indagini istopatologiche; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (sede di Brescia) per il supporto tecnico per le indagini microbiologiche.

MATERIALI E METODI

Nel corso dell'anno 2009 sono state esaminate 594 vesciche di scrofette dell'età di 9 mesi e del peso di 150-170 kg, regolarmente macellate presso uno stabilimento della provincia di Cuneo.

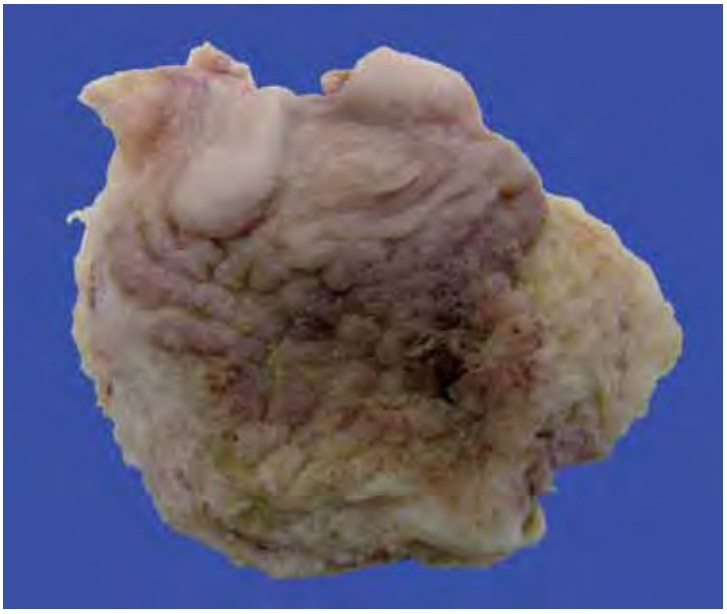


Fig. 2 – Vescica con flogosi acuta.

L'indagine si è svolta secondo le seguenti fasi:

1. individuazione di 5 allevamenti fornitori secondo il criterio di casualità;
2. prelievo dell'urina contenuta nelle vesciche previa flambatura della parete nel punto di prelievo, per gli esami batteriologici;
3. apertura delle vesciche per l'esame macroscopico, prelievo di un frammento di parete e sua fissazione in formalina tamponata o in alcol etilico al 70% per gli esami istopatologici;
4. identificazione di ogni campione di urina e del frammento di vescica;
5. le osservazioni effettuate sulla vescica e su altri organi sono state registrate su schede appositamente predisposte, per consentire di risalire all'allevamento di origine e per una valutazione comparativa della prevalenza delle patologie nella popolazione degli allevamenti considerati.

RISULTATI

In tabella 1 sono riportati i risultati delle indagini anatomo-patologiche, isto-patologiche e microbiologiche.

In particolare si rileva che:

- la sintomatologia clinica era sempre assente alla visita *ante-mortem*;
- la prevalenza di patologie rilevate a carico delle vesciche supera talvolta il 20% in alcune partite, rappresentate prevalentemente da focolai infiammatori ed ulcere, e presenza di uroliti e sedimenti sotto forma di accumulo di materiale poltaceo e pastoso di colore bianco-grigio-giallastro, talvolta simil-gessoso o farinoso umido, che ricopriva in quantità più o meno abbondante la mucosa vescicale, espressione di tesaurismosi dei corpi purinici (guaninosi, xantinosi);
- le prove microbiologiche, eseguite su un totale di 69 campioni di urina, hanno fornito in 27 casi esito negativo, mentre in 42 campioni si è ottenuto l'isolamento di batteri;

- la specie batterica più frequentemente isolati è risultata *E. coli,* seguita da *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.; isolamenti occasionali si sono avuti per *Serratia* sp. e *Proteus* sp.;
- non sono presenti correlazioni significative tra le lesioni riscontrate alla vescica, i batteri isolati e le patologie concomitanti evidenziate a carico di altri distretti (polmoni, intestino, reni, linfonodi);
- le vesciche con flogosi più gravi contenevano scarse quantità di urina, probabilmente a causa del deficit funzionale della muscolatura vescicale e degli sfinteri;
- l'urolitiasi e la presenza di sedimenti nella vescica era spesso associata all'assenza di riscontri infiammatori a carico della mucosa vescicale e del rene;
- il riscontro di numerose ovaie attive e di uteri gravidi (con una prevalenza rilevata pari al 3,5% in alcune partite) indurrebbe a considerare il coito quale fattore di contaminazione del tratto uro-genitale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In base alle nostre osservazioni si può affermare che nell'8% delle vesciche delle scrofe macellate sono presenti lesioni di tipo infiammatorio localizzate sulla mucosa e nella tonaca muscolare non solo ad andamento acuto o subacuto, ma anche cronico, sotto forma di fenomeni riparativi quali tessuto di granulazione ampiamente diffuso nello spessore della parete, fibrosi cicatriziale e metaplasia adiposa.

Se l'istopatogenesi delle suddette alterazioni sembra essere piuttosto semplice, secondo le fasi caratteristiche della flogosi, viceversa non risultano ancora chiari i fattori eziologici responsabili, i quali sicuramente intervengono precocemente durante la vita dell'animale.

Altrettanto interessanti sono l'accumulo di uroliti e i depositi di residui purinici (xantinosi, guaninosi) riscontrati nella vescica di circa il 3% dei soggetti, a volte in quantità molto abbondanti, con conseguenti fenomeni degenerativi e flogistico-necrotici dell'epitelio.

Per quanto riguarda i risultati degli esami microbiologici, le specie batteriche riscontrate sono quelle più comunemente isolate, da sole o in associazione, dalla vescica delle scrofe, come indicato in precedenti studi (Stirnimann, 1984; Colman *et al*., 1988; Berner, 1990), mentre non è stato identificato nella presente indagine *Actinobaculum suis,* comunemente indicato come responsabile delle più gravi infezioni del tratto urinario del suino (Stirnimann e Tschudi, 1985; Carr e Walton, 1993),

Per quanto riguarda la patogenesi delle cistiti riscontrate nella presente indagine, si può ipotizzare che sia da ricondurre prevalentemente a forme ascendenti, nelle quali la risalita dei patogeni lungo il tratto genito-urinario sarebbe in particolare favorita da:

- scadenti condizioni di igiene ambientale,
- fattori stressogeni in grado di determinare una riduzione della resistenza individuale (alimentazione, terapie antibiotiche, aggressività),
- accoppiamenti nei box che ospitano criptorchidi, la cui prevalenza, in taluni allevamenti, raggiunge valori dell'1%.

Sebbene non siano state rilevate forme cliniche conclamate di sofferenza vescicale, non si escludono possibili ripercussioni negative a carico della produttività all'ingrasso e della fertilità negli allevamenti da riproduzione, tali da incidere in modo significativo sul bilancio aziendale. Si rendono comunque necessari ulteriori approfondimenti per chiarire tali ipotesi.

I risultati ottenuti nel presente lavoro rendono infine auspicabile l'adozione dei seguenti provvedimenti:

- l'attuazione di un flusso di informazioni tra macello ed allevamento, così previsto e regolamentato a livello europeo dalla normativa sulla Catena Alimentare (Reg. CEE

852/2004);
- l'esecuzione di approfondimenti negli allevamenti segnalati a seguito del riscontro di osservazioni effettuate al macello, al fine di completare i dati provenienti dagli stabilimenti e, ove necessario, applicare gli interventi correttivi.

In conclusione, i risultati preliminari costituiscono un interessante punto di partenza per ulteriori ricerche sia sui soggetti con lesioni sia in allevamento, tenendo in considerazione il management, la dieta, la genetica e le eventuali infezioni intercorse, in modo da poter intervenire per prevenire tali patologie.

BIBLIOGRAFIA

- Berner H. (1988) "Cystitis in der MMA-Diagnostik" Prakt. Tierarzt, 69,124-131.
- Berner H. (1990) "Erregerwechsel als Ursache von Misserforlgen bei der Therapie bakteriell bedingter Krankheiten der Urogenitalorgane des Schweines" Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 97, 20-24.
- Bollwahn W., Amhofer G. (1989) "Die Bedeutung exogener Faktoren fur die Zusammensetzung des Harns der Zuchtsauen.
- " Tierarztl. Prax., 17, 43-46.
- Carr J, Walton J.R (1993) "Bacterial flora of the urinary tract of pigs associated with cystitis and pyelonephritis" Vet. Rec., 132, 575-577.
- Carr J., Walton J., Done S. (1995) "Cystitis and ascending pyelonephritis in the sow" In Practice, 17, 71-79.
- Colman J., Devriese L., Verdonck M. (1988) "Bacteriuria and urinary tract infection in sows" Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 57,192-198.
- Fairbrother J.M. (2006) "Urinary tract infection" in: Straw B., Zimmermann J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine" 9th Ed., Oxford, Blackwell Publishing, 671-674.
- Häni H., Brändli A., Luginbühl H., König H. (1976) "Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsgutes (1971-1973)" Schweiz. Arch. Tierheilkd., 118, 1-11.
- Maes D.G.D., Vrielinck J., Millet S., Janssens G.P.I., Deprez P. (2004) "Urolithiasis in finishing pigs" Vet. J., 168, 317-322.
- Stirnimann J. (1984) "Akute Harnwegentzündung bei der Muttersau". Schweiz. Arch. Tierheilkd., 127, 597-605.
- Stirnimann J., Tschudi P.R. (1985) "Beurteilung der Nierenfunktion bei Muttersauen mit akuter Harnwegsentzündung" Schweiz. Arch. Tierheilkd., 127, 575-582.

OSSERVAZIONI DIAGNOSTICHE SULLE INFEZIONI URINARIE (UTI) DELLA SCROFA

DIAGNOSTIC OBSERVATIONS ON THE SOW URINARY TRACT INFECIONS (UTI)

GUSMARA C.[1], INVERNIZZI F.[2], ANDREONI S.[3], TELI L.[3], MAZZOTTI A.[3], SALA V.[1]

[1] DIPAV – Università degli Studi di Milano; [2] Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche – Università degli Studi di Milano; [3] Medico Veterinario

Parole chiave: scrofa, infezioni urinarie, diagnosi
Key word: sow, urinary infections, diagnosis

Riassunto. Le infezioni urinarie delle scrofe (UTI) rappresentano un argomento di studio ancora controverso; in alcune realtà sono ritenute poco interferenti sulla redditività delle aziende, mentre diversi esperti europei attribuiscono loro un impatto consistente sulla produttività e sui profitti del settore suinicolo e alcuni Paesi, come la Francia, hanno focalizzato la propria attenzione su tutti gli aspetti che possono favorire l'insorgenza di tali disordini.
Sulla base dei dati fino ad oggi disponibili nasce quindi l'esigenza di stabilire la reale incidenza della problematica nelle scrofe allevate in modo intensivo nel nostro Paese per poter contribuire successivamente alla valutazione complessiva dell'interferenza delle UTI nei confronti della produttività delle scrofaie; è stato quindi definito un protocollo diagnostico affidabile, facilmente applicabile, che ha permesso l'analisi di un gran numero di soggetti con costi sostenibili (anche nelle contingenze economiche attuali). Questo lavoro rappresenta, in assoluto, la prima indagine di questa natura condotta nel sistema suinicolo italiano; i dati per ora disponibili indicano che, analogamente a quanto avviene in altre aree geografiche, le infezioni urinarie sono un problema presente e potenzialmente interferente sulla produttività della scrofa.

Summary. The urinary infections of sows (UTI) still represent a controversial matter of study. Some American authors consider this problem poorly disturbing the farm profitability while many European experts attribute to UTI a substantial impact on the productivity and income of the pig production. On the basis of the literature data we have thought necessary to establish the real incidence of the problem in the Italian swine system and to understand the UTI interference on the breeding productivity. Therefore a reliable diagnostic protocol has been defined. It is easily applicable and has allowed the analysis of a big number of subjects with sustainable costs (also in the actual economic situation). This paper absolutely represents the first investigation on UTI in Italy. The available data indicate that, likewise in other geographical areas, the urinary infections are a present and potentially interfering problem on the productivity of the sow.

INTRODUZIONE

I processi infiammatori dell'apparato urinario possono avere origine infettiva e coinvolgere, in direzione ascendente, uretra, vescica, ureteri, bacinetto renale e reni che, essendo naturalmente sterili, sono colonizzate da batteri aspecifici o specifici del tratto urinario; tutti i microrganismi coinvolti sono in grado di aderire all'epitelio di transizione delle vie urinarie e possono avere origine enterica, cutanea o ambientale.
Perciò, le infezioni del tratto urinario (Urinary Tract Infections – UTI) si dividono in aspecifiche e specifiche: le prime sono localizzate alla vescica e originano essenzialmente dalla contaminazione fecale perineale, mentre quelle specifiche, di più rara occorrenza e a evoluzione acuta purulenta o emorragica, sono riportabili ad *Actinobaculum suis*, microrganismo commensale nel diverticolo

prepuziale del verro.
Quando i batteri fecali riescono a colonizzare la vagina, risalgono l'uretra, relativamente corta nelle scrofe, e raggiungono la vescica e, se trovano condizioni idonee, aderiscono e moltiplicano; le forme cliniche hanno spesso andamento cronico, sono predisponenti le infezioni dell'utero gravido e, attraverso l'ambiente, anche le mastiti post-partum. Più raramente, in animali particolarmente predisposti, i processi possono estendersi alle alte vie urinarie e ai reni, sotto forma di pielonefriti e nefriti interstiziali.
In patologia suina, l'interesse per le UTI è cresciuto solo in anni recenti, in concomitanza con l'intensificazione della produzione e con l'evoluzione delle conoscenze sulle batteriosi opportunistiche; a oggi, solo pochi gruppi di ricerca si sono interessati all'argomento, motivati dalle possibili interferenze della patologia urinaria sull'efficienza produttiva delle scrofe (bassa prolificità, ritorni in calore, parti languidi e natimortalità eccessiva) e dalla constatazione dell'importanza del problema tra cause di mortalità e riforma delle scrofe.
I dati europei più aggiornati provengono dalla realtà francese, dove l'incidenza delle UTI è pari al 25%, mentre in Canada e negli USA il 20-40% delle scrofe a fine carriera mostra segni d'infezioni aspecifiche dell'apparato urinario; soprattutto in Europa si reputa che esse abbiano un grande impatto sulla produttività e sui profitti del settore suinicolo, anche se, a oggi, la letteratura disponibile non ha perfettamente definito, come in altre patologie condizionate, del resto, l'interferenza del "country effect".
In Italia, se si escludono pochi lavori dell'ambito anatomo-patologico, il problema non è stato affrontato in modo sistematico, soprattutto per quel che riguarda gli aspetti epidemiologici e batteriologico-diagnostici; da qui muovono le motivazioni dell'indagine sperimentale, i cui risultati sono riportati in questa nota, e che si è prefissa di stabilire la reale incidenza della problematica nelle scrofe intensivamente allevate nel nostro Paese.
Organizzazione e metodi applicati sono stati concordati nell'ambito di un Expert Panel internazionale, riunitosi a Lisbona nel dicembre 2006, con il patrocinio di Vetoquinol Academia; in quella sede, ci si è proposti di valutare, nei sistemi suinicoli di diversi Paesi europei, l'effettiva presenza, l'impatto produttivo e la rilevanza economica delle infezioni urinarie della scrofa. È stato quindi definito un protocollo diagnostico-sperimentale facilmente applicabile, non invasivo per gli animali, che permettesse l'analisi di un gran numero di soggetti a costi sostenibili.

MATERIALI E METODI

Sono stati organizzati screening di scrofaia per valutare l'effettiva presenza delle infezioni e delle patologie urinarie; i prelievi sono stati eseguiti in 16 allevamenti della pianura padana, raccogliendo in ciascuno un numero di campioni variabile in relazione alle dimensioni dello stesso, ma mai inferiore a 10.
Per osservare le variazioni dei parametri diagnostici in rapporto alla fase di carriera e del ciclo delle scrofe, i prelievi sono stati eseguiti sia nella fase di gestazione, sia nel post-parto, raccogliendo 690 campioni di urine (188 da scrofe in lattazione, 463 da scrofe in gestazione e 39 da scrofe a fine lattazione, prima della fecondazione).
I prelievi sono stati eseguiti raccogliendo in un contenitore sterile l'urina eliminata durante la minzione spontanea; questa modalità di prelievo, a differenza di altre più complesse come il cateterismo vescicale o la cistocentesi, presenta il vantaggio della praticità (non servono specifiche competenze da parte dell'operatore) e dell'assenza di stress per l'animale; esiste però il rischio della contaminazione del campione con batteri di origine fecale derivanti dalla regione perineale o con la flora microbica saprofita presente nell'uretra, nel vestibolo vaginale e sulla vulva. Per ovviare a questo inconveniente, è preferibile scegliere animali poco imbrattati e scartare dalla raccolta i primi e gli ultimi getti di urina.

In tutti gli allevamenti sono state prelevate le prime urine del mattino, in modo che il campionamento risentisse il meno possibile delle differenze d'abbeverata degli animali; queste urine presentano inoltre il vantaggio aggiuntivo di una maggior permanenza in vescica, mostrando di conseguenza le alterazioni più evidenti dei parametri rilevati.
Nelle infezioni urinarie da batteri Gram negativi, ad esempio, è più probabile che gli enzimi batterici abbiano avuto il tempo sufficiente per agire sui nitrati presenti a livello urinario trasformandoli in nitriti; ogni recipiente è stato poi identificato con un numero progressivo accompagnato dai dati dell'animale da cui è stato prelevato.
I campioni sono stati quindi avviati al laboratorio di analisi (Sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano) mantenendoli a temperatura di refrigerazione (+5°C) per evitare alterazioni della carica microbica iniziale; per la diagnosi sono stati utilizzati tre metodi complementari: esame fisico o macroscopico, chimico e batteriologico.
Esame chimico e fisico
L'esame chimico delle urine è stato eseguito direttamente in azienda tramite strisce reattive ad uso veterinario (Uri – Screen 10, Dutch Diagnostics); tra i parametri valutabili sono stati considerati la presenza di sangue, leucociti e nitriti, la concentrazione di proteine, il valore di pH e la densità.
La valutazione del peso specifico e del pH urinario è stata in seguito più precisamente rivalutata, all'arrivo dei campioni in laboratorio, con l'ausilio di un rifrattometro (Atago Sur-Ne) e di un pH-metro (Crison Basic 20); è stato inoltre eseguito l'esame fisico, per rilevare il colore, l'odore e l'aspetto macroscopico.
Sono stati sottoposti al conteggio batterico selettivo i campioni urinari che hanno mostrato alterazione di almeno un parametro chimico; per la continuazione dell'iter diagnostico è stata considerata indicativa anche la torbidità del campione.
Esame Batteriologico
La carica batterica delle urine, diluite in base 10, è stata valutata su Aesculin Bile Azide Agar per *Enterococcus* spp., su Staphylococci 110 Medium agar per *Staphylococcus* spp. e Mac Conkey agar per i batteri coliformi, inoculando 0,1 ml per ogni diluizione.
Il conteggio delle colonie batteriche è stato eseguito dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore; secondo gli accordi stabiliti nell'Expert Panel di riferimento, sono stati applicati i seguenti criteri interpretativi:

- conteggio inferiore a 100.000 UFC/ml di urina: batteriuria asintomatica;
- conteggio tra 100.000 e 200.000 UFC/ml di urina: UTI subacuta o cronica;
- conteggio superiore a 200.000 UFC/ml di urina: UTI acuta.

Per i conteggi superiori a 100.000 UFC/ml, le colonie batteriche a morfologia predominante sono state isolate e identificate su base biochimica o mediante API-System.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Per ragioni di sintesi e in conseguenza della limitatezza dello spazio editoriale, ci limitiamo qui ad un'esposizione riassuntiva, ma crediamo esaustiva, dei dati ottenuti; gli stessi saranno oggetto di pubblicazione integrale su una rivista scientifica del settore, successivamente al congresso.

pH urinario
Il pH urinario delle scrofe varia considerevolmente tra gli animali, assumendo valori compresi tra 5 e 9; tuttavia, nella maggior parte dei casi, i valori si collocano nella zona di neutralità: infatti, il 67.4% delle urine nelle scrofe in gestazione e il 60% delle urine nel dopo svezzamento hanno pH 7. Durante l'allattamento questa percentuale scende invece al 44,7%

per la tendenza dei valori a disperdersi verso pH 6 (21,3%) e in maggior misura verso un pH basico (31,4%).

Peso specifico
Il peso specifico rappresenta la densità urinaria, cioè la quantità di materiale disciolto nelle urine; è inoltre indicativo della capacità del rene di concentrare le urine e, negli animali sani, può anche indirettamente servire a stimare la corretta assunzione d'acqua con l'abbeverata.
Nel suino, il peso specifico fisiologico è compreso tra 1.010 e 1.015; quando è inferiore a 1.005, la quantità di acqua ingerita è troppo alta o è in corso un'insufficienza renale cronica, mentre se supera 1.015, il razionamento idrico è eccessivo, oppure si è alla presenza di una bassa capacità di filtrazione renale, o ancora sono pensabili interferenze da parte di un razionamento scorretto.
Durante l'allattamento il 40,4% delle scrofe ha un peso specifico urinario che supera il valore di 1.015, ciò molto probabilmente è legato al fatto che in questo momento del ciclo produttivo l'assunzione di acqua è insufficiente e non riesce comunque a controbilanciare efficacemente la necessità idrica dell'organismo conseguente alla lattogenesi; di conseguenza, le urine sono più concentrate e il peso specifico più alto.
Infine, il 30,8% delle scrofe nel dopo svezzamento e il 37,1% delle scrofe in gestazione consumano invece acqua in eccesso, avendo un peso specifico inferiore a 1.005.

Esame fisico-chimico e batteriologico
L'esame batteriologico ha permesso di rilevare che il 15,2% delle scrofe (105 su 690) presenta UTI, in altre parole, una conta batterica superiore a 10^5 UFC/ml; questo evento è indipendente dalla fase del ciclo produttivo (29 scrofe, pari al 15,4% in lattazione; 70 scrofe, pari al 15,11% in gestazione; 6 scrofe, pari al 15,38% nel post-svezzamento). Le percentuali di scrofe con infezioni urinarie variano considerevolmente nei 16 allevamenti considerati (da 2,5% a 32,14%) ma nessuno è esente da problemi.
Come si può facilmente desumere dalla successiva tabella 1, si tratta essenzialmente d'infezioni aspecifiche riportabili a batteri di origine fecale, con una netta predominanza colibacillare.

Batteri isolati	N. isolamenti	(%) sugli isolamenti
Escherichia coli	94	89,5
Klebsiella pneumoniae	3	2,9
Enterococcus faecalis	2	1,9
Proteus spp.	1	0,9
E. coli + Proteus spp. + E. faecalis	1	0,9
E. coli + E. faecalis	2	1,9
Staphylococcus spp.	2	1,9

Tabella 1. Batteri isolati in casi di UTI.
Table 1. Bacterial isolates in UTI cases.

Tra i parametri valutati dalle strisce reattive, la presenza di proteine è stata individuata nel 13,2% delle urine, quella del sangue nell'1,3% e quella dei nitriti nel 6,8% dei prelievi urinari; quest'ultima è riferibile anche alla moltiplicazione dei batteri Gram negativi e, infatti, nel 93,6% delle urine positive per i nitriti è stata determinata una carica microbica superiore a 10^5 UFC/ml, indicativa di UTI.
D'altra parte, nel 58,1% delle urine batteriologicamente positive i nitriti non sono stati rilevati e ciò genera più di un dubbio riguardo all'impiego di questo parametro come chiave per la prosecuzione dell'iter diagnostico; all'esame visivo, la maggior parte delle urine si sono presentate trasparenti (82,2%) e di colore giallo paglierino (54,1%), mentre la torbidità è stata riscontrata nel 17,8% dei campioni.
La torbidità è dovuta alla presenza di materiale in sospensione, che a sua volta può derivare da un'infezione dell'apparato urinario, da una contaminazione di derivazione ambientale per un prelievo non idoneo, oppure essere fisiologico rispetto a una fase del ciclo riproduttivo della scrofa; tuttavia, alle urine torbide non sempre corrisponde una proliferazione batterica e, nello stesso tempo, in una piccola parte di urine limpide (8,3%) è stata ritrovata una carica batterica elevata. La torbidità ha quindi un valore puramente indicativo.
Ugualmente poco indicativa è la correlazione tra le concentrazioni batteriche, il pH e il peso specifico; è nostra convinzione che questi due parametri vadano comunque presi in esame, soprattutto per verificare la qualità dell'acqua in azienda e la correttezza dell'approvvigionamento idrico da parte delle scrofe.
Anche nel nostro studio,analogamente a quanto già riportato in letteratura, le diagnosi di UTI acute sono più numerose nelle scrofe pluripare rispetto alle primipare; di fatto, con l'età, le gestazioni e la permanenza in azienda, aumenta anche l'esposizione della scrofa alla contaminazione ambientale e, di conseguenza, il rischio infettivo.
Nella stessa misura aumentano i traumatismi della regione uro-genitale, conseguenti al parto e alle ispezioni ostetriche correlate, con i risultati e le conseguenze descritti in precedenza; nelle scrofe più anziane inoltre, è maggiore anche il ristagno d'urina in vescica post-minzione e ciò determina, nel tempo, prima la colonizzazione e poi la moltiplicazione batterica.

numero di parti	da 0 a 3	da 3 a 6	più di 7
UTI	8,4%	18,3%	20%

Tabella 2. Correlazione tra UTI e carriera.

Table 2. Correlation between UTI and sow career.

CONCLUSIONI

Adattabilità, maneggevolezza, gestibilità tecnica e problemi interpretativi del protocollo diagnostico hanno sicuramente rappresentato le problematiche più complesse da risolvere, ma i dati finora ottenuti confermano la correttezza dell'approccio diagnostico basato sul conteggio batterico delle urine che presentano alterazioni fisico-chimiche.
Le strisce reattive (dip-stick) hanno l'indubbio vantaggio del costo contenuto, ma le loro indicazioni sono solo orientative, perché con questo metodo una parte consistente delle scrofe risultate positive alle nostre valutazioni non sarebbe stato individuato; di conseguenza, si può utilizzare questo metodo per uno screening preliminare rapido a livello aziendale (livello di rischio della popolazione) ma non per una stima corretta dell'incidenza clinica del problema.

Com'era ampiamente atteso, la positività ai nitriti è stata maggiore nelle infezioni da Gram negativi, che producono l'enzima nitrato reduttasi responsabile della variazione; secondo alcuni Autori, il risultato potrebbe però essere condizionato dalla fase di gestazione e carriera della scrofa da cui proviene l'urina.
In ogni caso, abbiamo ritenuto che associare l'esame fisico delle urine all'impiego delle strisce reattive, prestando particolare attenzione alla valutazione della torbidità, permetta di aumentare la precisione diagnostica, in termini di accesso alla valutazione batteriologica quantitativa; sono già evidenti le correlazioni tra l'assenza di torbidità e la batteriuria asintomatica, e tra la positività ai nitriti e le infezioni da coliformi.
Non sono invece rapportabili la proliferazione batterica, l'alterazione del pH, la densità urinaria e la presenza di sangue, che potrebbe essere riportata ad altre cause, prevalentemente di natura traumatica.
Per i microrganismi opportunisti, come coliformi ed enterococchi, più frequentemente responsabili delle UTI aspecifiche, è indispensabile procedere ad una valutazione di tipo quantitativo, che permetta di misurare in unità formanti colonia (U.F.C.) il numero di batteri presenti in un millilitro di urina; la correlazione con la fase del ciclo produttivo ha permesso di rilevare che, negli allevamenti con problemi urinari nelle scrofe, non esistono differenze tra le scrofe in gestazione e quelle in lattazione, anche se le anomalie dei parametri fisici (densità più elevata e pH basico) sono più frequenti in lattazione, quando l'equilibrio idro-salino è più facilmente alterato.
Nonostante il numero relativamente ridotto di campioni esaminati, appare già evidente la variabilità nella frequenza e nella connotazione della patologia urinaria tra gli allevamenti; per una più completa comprensione del problema, già chiaramente connotabile come sindrome polifattoriale, è indispensabile valutare le condizioni predisponenti di natura ambientale e manageriale che possono favorire presenza e diffusione delle infezioni batteriche.
Tra questi fattori interagenti sono sicuramente di primaria importanza l'approvvigionamento idrico e le caratteristiche fisiche e chimiche dell'acqua, ma possono essere rilevanti nello sviluppo delle UTI anche le scarse condizioni igieniche favorenti un aumento della fecalizzazione ambientale e la presenza di patologie podali che condizionano la posizione di riposo delle scrofe.
Per finire, è prima di tutto necessario rilevare come questo lavoro rappresenti, in assoluto, la prima indagine di questa natura condotta nel sistema suinicolo italiano; i dati per ora disponibili indicano che, analogamente a quanto avviene in altre aree geografiche, le infezioni urinarie sono un problema presente e potenzialmente interferente sulla produttività della scrofa.
Le fasi successive del lavoro comprenderanno il perfezionamento del rilievo aziendale associato al prelievo urinario, con l'obiettivo di valutare se l'entità del condizionamento è tale da qualificare le UTI della scrofa tra le sindromi polifattoriali dell'allevamento suinicolo; infine, sono in corso indagini sperimentali volte alla qualificazione uropatogena degli isolamenti di *Escherichia coli* nella specie suina, analogamente a quanto dimostrato nelle altre specie animali e nell'uomo.

Bibliografia

- Almond G.W., Stevens J.B. (1996). "Techniques for urine analysis in a pig practice". Large Animals Review 2(3), 43-50.
- Biksi I., Takacs N., Vetesi F., Fodor L., Szenci O., Fenyõ E. (2002). "Association between endometritis and urocystitis in culled sows". Acta Vet. Hung. 50(4), 413-423.
- Cerati C., Piscitelli P. (2002). "Fabbisogni idrici e salute dei suini". Rivista di suinicoltura. 7, 71-79.
- Dumail L., Chevrier C., Messaoud S. (2006) "Effects of a dietary supplement, the MUT,

on the urinary parameters in gestating sows". Rev. Med. Vet. 157(11), 539-544.
- Girotto A.F., Sobestiansky J., Costa O.A. dalla, Matos M.P.C. (2002). "Economical evaluation of high incidence of urinary infection in female pigs". Acta Sci. Vet. 30(2), 87-92.
- Klopfenstein C., D'Allaire S., Martineau G.P. (1995). "Effect of adaptation to the farrowimg crate on water intake of sows". Liv. Prod. Sci. 43, 243-252.
- Leneveu P. (2006). "Conventional and emerging risk factors on farms with high health status". Proc. Int. Symp. UTI. Lisbona.
- Madec F. (1990). "Epidemiology of urinary problems in intensively managed sows". Bull. G.T.V. 2, 39-45.
- Martineau GP., Almond G. (2008). "Urinary tract infections in female pigs". Persp. Agr. Vet. Sci., Nutr. Nat. Res. 3(48), 1-9.
- Osborne C.A. (1999). "Urianalysis: A clinical guide to compassionate patient care". Ed Veterinary Learning System. 11, 125-149.
- Sala V. (2007). "Significato e importanza delle infezioni urinarie della scrofa". Summa, An. Redd. 2(3), 43-47.
- Sansot B., Jouglar J.Y., Maes H. (1998). "Urinary infections in sows: use of the urinary germ count method (UGC). A review and field survey". Rev. Med. Vet. 149(11), 1013-1020.
- Waller C.M., Bilkei G., Cameron R.D.A. (2002). "Effect of periparturient diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive Performance". Austr. Vet. J. 80(9), 545-549.
- Wanyoike S.K., Bilkei G. (2006). "Concurrent pathological and bacteriological findings in the urogenital organs and mammary glands of sows culled because of chronic vulvovaginal discharge and swine urogenital disease (SUGD): a case study". Tijd. Dierg. 131(19), 686-691.
- Wendt M. (1998). "Urinary system disorders of pigs". The 15th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Proc. Birmingham, England, 195-201.

SIEROTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* ISOLATI DA CAMPIONI PATOLOGICI

SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF HAEMOPHILUS PARASUIS STRAINS ISOLATED FROM PATHOLOGICAL SAMPLES

LUPPI A.[1], BONILAURI P.[1], FERRARI E.[2], GHERPELLI Y.[1], MERIALDI G.[1], DOTTORI M.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER); [2]ASL di Modena, Distretto di Carpi

PAROLE CHIAVE: *Haemophilus parasuis*, sierotipizzazione, immunodiffusione in agar gel
KEY WORDS: *Haemophilus parasuis*, serotyping, gel diffusion (GD)

RIASSUNTO. Quarantaquattro ceppi di *Haemophilus parasuis* sono stati isolati nel periodo 2007-2009 da tessuti patologici di suino durante l'attività diagnostica di routine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Sezione di Reggio Emilia. I ceppi sopraccitati sono stati sottoposti a sierotipizzazione impiegando gli antisieri nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13. La scelta e l'acquisto degli antisieri si è basata su dati di prevalenza riportati da diversi autori in altri paesi europei. Il sierotipo 4 è risultato il più prevalente (34%) seguito dal sierotipo 13 (22,7%) e dal sierotipo 5 (15,9%). I ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 22,7%. I ceppi isolati sono stati suddivisi in due gruppi a seconda che l'isolamento sia stato effettuato da casi di malattia sistemica (polisierosite fibrinosa, artrite e meningite) o semplicemente dalle vie respiratorie profonde. Il dato principale che si evince da questa valutazione è una maggior prevalenza del sierotipo 4 in forme sistemiche piuttosto che in casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (broncopolmonite). L'isolamento dei sierotipi 5 e 13 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite fibrinosa è sovrapponibile, mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere più frequentemente associati alle forme cosiddette non sistemiche.

ABSTRACT. From 2007-2009 a total of 44 *Haemophilus parasuis* field isolates was collected from diseased pigs in connection with routine diagnostics of Istituto Zooprofilattico of Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The isolates were serotyped by agar gel immunodiffusion test using specific antisera against serovars 2, 4, 5, 12, 13. The choice of antisera used was performed considering the prevalence of different virulent serotypes described in other european countries. In our study serovar 4 was the most prevalent (34%) followed by serovar 13 (22,7%) and serovar 5 (15,9%), while 22,7% of the isolates could not be assigned to a serovar (nontypaple isolates). The strains could be divided into two groups depending on whether they were isolated from cases with systemic disease (polyserositis, arhritis or meningitis) or if they only were found in the lower respiratory tract. The most marked difference were observed for serovar 4, which had a higher prevalence in systemic infection compared to respiratory disease. The frequency of the isolation of serotypes 5 and 13 from pigs with o without polysierositis were similar, while nontypaple isolates had a higher prevalence in respiratory disease compared to systemic infection.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è un batterio pleomorfo, nicotinammide adenina dinucleotide (NAD)-dipendente, Gram negativo, considerato l'agente eziologico responsabile della malattia di

Glässer, caratterizzata da polisierosite fibrinosa, poliartrite e meningite. Oltre alla forma che potremmo definire classica, si possono incontrare casi di malattia acuta setticemica in cui si osservano esclusivamente quadri di broncopolmonite in assenza di polisierosite. In alcuni casi, infine, possono essere isolati ceppi di *H.parasuis* commensali delle prime vie dell'apparato respiratorio in assenza di malattia (Angen et al., 2004). La malattia di Glässer è stata considerata storicamente una patologia sporadica e stress-associata, tuttavia, in alcuni allevamenti assume i connotati di malattia contagiosa ad elevata morbilità e mortalità con importanti perdite economiche. *H.parasuis* presenta una marcata eterogeneità antigenica, in relazione alla quale è stato classificato in 15 sierotipi a cui sono stati associati diversi gradi di virulenza (tabella 1).

Tabella1: Valutazione della virulenza dei diversi sierotipi di *H.parasuis* in seguito ad inoculazione intraperitoneale in suini SPF (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).
Table1: Serotypes virulence evaluation in SPF pigs intraperitoneally inoculated (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

Sierotipi	**Virulenza**
1,5,10,12,13,14	Alta: malattia grave con elevata mortalità entro 4 giorni dall'infezione
2,4,15	Moderata: polisierosite con mortalità bassa o assente
8	Bassa: lievi sintomi e lesioni
3,6,7,9,11	Assente: assenza di sintomatologia clinica e lesioni.

La prevalenza dei diversi sierotipi varia a seconda dell'area geografica considerata, come riportato in numerosi lavori scientifici (tabella 2), tuttavia i dati relativi alla realtà italiana sono assolutamente carenti.

Tabella 2: Prevalenza dei sierotipi di *Haemophilus parasuis* isolati in diverse aree geografiche ([a]Blackall et al., 1996; [b]Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; [c]Oliveira et al., 2003; [d]Angen et al., 2004; [e]Rùbies et al., 1999; [f]Kielstein and Wuthe, 1998; [g]Cai et all., 2005.).
Table 2: *Haemophilus parasuis* serovars prevalence and geographical origin ([a]Blackall et al., 1996; [b]Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; [c]Oliveira et al., 2003; [d]Angen et al., 2004; [e] Rùbies et al., 1999; [f]Kielstein and Wuthe, 1998; [g]Cai et all., 2005.).

Area geografica	**Sierotipo (%)**
Australia[a]	5 (23%), 13 (19%), 4 (13%), 9 (6%); 1,(3%), 2 (3%), 12 (3%), NT* (29%)
Canada[b]	5 (24%), 4 (16%), 13 (11%), 14 (9%), 2 (8%), 12 (7%), NT*(15%)
Stati Uniti[c]	4 (39%), 3 (8%), 12 (7%), 1 (7%), 2 (4%), 14 (3%), NT* (27%)
Danimarca[d]	5 (36%), 13 (22%), 4 (13%), , NT* (15%)
Spagna[e]	5 (18%), 4 (16%), 2 (9%), 13 (8%), 7 (4%), NT* (29%)
Germania[f]	5 (24%), 4 (17%), 2 (5%), 13 (4%), 12 (3%), 7 (2%), NT* (26%)
Cina[g]	4 (24%), 5 (19%), 13 (12%), 14 (7%), 12 (7%), NT* (12%)

* NT: non tipizzabili;

Il controllo della malattia può essere raggiunto sia attraverso la vaccinazione (Oliveira and Pijoan, 2004) sia con l'impiego di misure terapeutiche (Aarestrup et al., 2004). Il dato relativo alla prevalenza dei sierotipi di *H.parasuis* circolanti in una determinata area è di notevole importanza quando la vaccinazione viene scelta come metodo di controllo della malattia. A tal proposito, la variabilità antigenica tra ceppi diversi di *H.parasuis* è stata confermata da numerosi studi che hanno evidenziato come il grado di cross-protezione fra differenti sierotipi sia variabile (Bak and Riising, 2002). Per quanto riguarda l'impiego della terapia nel controllo della malattia esiste una certa variabilità nella risposta ai trattamenti antibiotici tra ceppi isolati in diversi paesi europei e questo, unitamente alla difficoltà di allestimento di prove di sensibilità in vitro (antibiogrammi, MIC ecc.), rende l'intervento terapeutico nei confronti di *H.parasuis* non privo di incognite (De la Fuente et al., 2007).
Nel presente lavoro si riporta l'attività di sierotipizzazione di ceppi di *H.parasuis* isolati durante l'attività diagnostica di routine svolta presso la Sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) nel periodo 2007- 2009.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed indagini batteriologiche

Durante l'attività diagnostica di routine della Sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo 2007-2009, il materiale patologico conferito per accertamenti diagnostici è stato sottoposto alle indagini di laboratorio ritenute più opportune sulla base dei quadri anatomopatologici osservati. In particolare, le indagini batteriologiche in presenza di lesioni macroscopiche riferibili a patologia respiratoria (polmonite, broncopolmonite, pleurite) con coinvolgimento o meno di altri distretti (artrite, meningite e pericardite), hanno previsto la semina del materiale patologico su tre terreni colturali come da protocollo standardizzato presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione. I terreni colturali impiegati sono stati: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con nicotinammide adenina dinucleotide – NAD. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere la crescita di quei patogeni che, come l'*Haemophilus parasuis*, necessitano di V growth factor (nicotinammide adenina dinucleotide-NAD). L'agar siero e l'agar Gassner sono stati incubati in aerobiosi mentre l'agar sangue addizionato con NAD in termostato a CO2 al 10%. In tutti i casi l'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore. La presenza di *H.parasuis* è stata confermata tramite test biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti ed ureasi negative), morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica al microscopio ottico dopo colorazione di Gram) e biomolecolari tramite PCR (Olivera et al., 2001).
Le colonie batteriche per morfologia assimilabili ad *Actinobacillus pleuropneumoniae, Streptococcus suis, Bordetella bronchiseptica, Escherichia coli* e *Pasteurella multocida* sono state fenotipizzate impiegando metodi biochimici e microbiologici in uso presso la Sezione di Reggio Emilia.

Sierotipizzazione

I ceppi di *H.parasuis* isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione tramite immunodiffusione in gel di agar (AGID), seguendo la metodica descritta da Rafiee M. and Blackall P.J. nel 2000. Nel protocollo di sierotipizzazione sono stati impiegati gli

antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2,4,5,12 e 13, scelti ed acquistati presso il Gallant Custom Laboratory (Canada) sulla base di dati di prevalenza raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi paesi europei (Blackall et al., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliviera et al., 2003; Angen et al., 2004; Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Cai et all., 2005.). Oltre a questo parametro, nella scelta degli antisieri da utilizzare, è stato considerato il grado di virulenza dei singoli sierotipi (il pannello di antisieri a nostra disposizione permette la sierotipizzazione della maggioranza dei sierotipi a media e ad alta virulenza) e la possibilità di valutare l'eventuale omologia tra i sierotipi circolanti e quelli presenti nelle preparazioni vaccinali.
Il protocollo di sierotipizzazione ha previsto le seguenti fasi che vengono brevemente riportate di seguito. Il ceppo in esame cresciuto in purezza su due piastre di agar sangue addizionate con NAD è stato raccolto utilizzando come soluzione di lavaggio 1,5 ml di PBS per piastra. La sospensione batterica ottenuta è stata sottoposta a trattamento in autoclave per 90 minuti ad una temperatura di 120°C e a successiva centrifugazione a 2000 giri per 10 minuti. Il sovranatante (antigene) ottenuto è stato successivamente utilizzato per la sierotipizzazione.
La metodica di immunodiffusione è stata eseguita utilizzando piastre di agar gel in cui sono state praticate una serie di quattro "rosette" di fori, ognuna composta da un foro centrale e sei fori periferici idonei ad ospitare rispettivamente 35 μl di siero positivo di referenza e 35 μl di ognuno dei 6 antigeni, di cui 5 appartenenti a ceppi batterici in esame ed uno di referenza omologo al siero positivo impiegato.
Le piastre sopraccitate, dopo l'allestimento della prova, sono state incubate a temperatura ambiente e la lettura è stata eseguita a 36, 48 e 72 ore, andando a valutare l'eventuale formazione di una banda di precipitazione tra i pozzetti contenenti gli antigeni batterici in esame e l'antisiero noto corrispondente.

Analisi statistica
Le differenze tra le frequenze dei sierotipi di *H. parasuis* isolati, rispetto alle lesioni anatomopatologiche riscontrate (polisieirosite e broncopolmonite), sono state confrontate tramite test χ^2 con livello di significatività $p<0.05$.

RISULTATI
I 44 ceppi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2009 da altrettante carcasse di suino, sono stati identificati come sierotipo 4 (34%), sierotipo 13 (22,7%), sierotipo 5 (15,9%), sierotipo 2 (2,2%) e sierotipo 12 (2,2%). I ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 22,7% sul totale.
L'isolamento di *H.parasuis* è stato ottenuto in 23 casi da materiale patologico prelevato da suini presentanti le caratteristiche lesioni riferibili a malattia di Glässer (forma sistemica). Nei restanti casi (21/44), l'esame anatomopatologico ha evidenziato esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale. Relativamente alle lesioni riscontrate, nell'87% dei casi di polisierosite, i ceppi isolati appartenevano ai sierotipi 4 (48%), 13 (26%) e 5 (13%), mentre quelli non tipizzabili sono risultati essere soltanto il 9%. Nel 38% dei casi di broncopolmonite i ceppi isolati sono risultati non tipizzabili, mentre i ceppi dei sierotipi 4,13 e 5 sono risultati egualmente rappresentati (tabella 3). Le differenze osservate tra frequenze dei diversi sierotipi e le lesioni riscontrate a livello anatomopatologico non sono risultate statisticamente significative (test χ^2).

Tabella 3: prevalenza dei sierotipi di *H.parasuis* sul totale dei ceppi isolati suddivisi in base alle lesioni rilevate in seguito ad esame anatomo-patologico.
Table 3: *H.parasuis* serotypes prevalence and gross lesions observed.

		Lesioni	
Sierotipo	**% sul totale**	**Polisierosite fibrinosa**	**Broncopolmonite**
4 (15 ceppi)	34%	11 (48%)	4 (19%)
13 (10 ceppi)	22,7%	6 (26%)	4 (19%)
5 (7 ceppi)	15,9%	3 (13%)	4 (19%)
12 (1 ceppo)	2,2%	0	1
2 (1 ceppo)	2,2%	1	0
Non tipizzabili (10 ceppi)	22,7%	2 (9%)	8 (38%)
TOTALE		23	21

I patogeni batterici isolati in concomitanza ad *H.parasuis* sono stati in ordine di frequenza: *P.multocida* 11/44, *S.suis* 5/44, *E.coli* 4/44, *A.pleuropneumoniae* 3/44 e *B.bronchiseptica* 2/44.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Negli ultimi anni *H.parasuis* si sta affermando tra le principali cause di mortalità nelle prime settimane di vita nei suinetti degli allevamenti italiani. I fattori che hanno determinato l'aumento dei focolai di malattia indotta da *H.parasuis* non sono conosciuti, tuttavia lo svezzamento precoce dei suinetti può avere un ruolo importante nell'epidemiologia della malattia, favorendo la precoce colonizzazione di ceppi virulenti del patogeno e la loro diffusione all'interno dell'allevamento (Oliveira et al., 2004).

Nel presente lavoro, la sierotipizzazione di *H.parasuis* ha previsto l'esclusivo impiego degli antisieri nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, scelti applicando i criteri già descritti in precedenza. Per questo motivo i risultati ottenuti sono da ritenersi parziali, tuttavia, permettono di descrivere in modo fedele la distribuzione dei principali sierotipi di *H.parasuis* circolanti sul nostro territorio. Questa distribuzione è risultata essere sovrapponibile a quella riportata in altri paesi europei da diversi Autori (tabella 2), con la netta prevalenza di 3 sierotipi: il sierotipo 4 (34%), il sierotipo 13 (22,7%) ed il sierotipo 5 (15,9%). I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 22,7% di quelli esaminati. Nonostante non sia possibile stabilire quale sia la reale percentuale dei ceppi realmente non tipizzabili o non tipizzabili con gli antisieri utilizzati nel presente lavoro, il dato ottenuto risulta sovrapponibile con quanto riportato in altri lavori scientifici sull'argomento (tabella 2).

Alcuni autori riportano dati comparativi che indicano come l'immunodiffusione in gel di agar fornisca risultati meno soddisfacenti rispetto alla emoagglutinazione indiretta nella tipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* (Del Rio et al., 2003; Tadjine et al., 2004). Quest'ultima infatti sarebbe in grado di abbassare di diversi punti percentuali il numero dei ceppi non tipizzabili. Tuttavia, in un recente studio di comparazione tra le due metodiche, riguardante l'attività di sierotipizzazione di ceppi di *H.parasuis*, non sarebbero emerse sostanziali differenze (Turni and Blackall, 2005).

Il dato che si evince dalla valutazione dei risultati indicati in tabella 3, che riporta l'associazione tra il sierotipo isolato e le lesioni anatomopatologiche rilevate, è la maggior prevalenza del sierotipo

4 in forme sistemiche piuttosto che in casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (broncopolmonite). Al contrario l'isolamento dei sierotipi 5 e 13 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite è sovrapponibile, mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere più frequentemente associati alle forme cosiddette non sistemiche. Dato il numero relativamente esiguo di ceppi impiegati, le differenze osservate non risultano statisticamente significative. Ad ogni buon conto, questa osservazione, che necessita di conferma, realizzabile attraverso la valutazione nel prossimo futuro di un numero maggiore di ceppi di *H.parasuis,* è in netto contrasto con quanto riportato da Angen et al. nel 2004, che descrive una maggior prevalenza del sierotipo 4 in forme non sistemiche rispetto a quelle sistemiche (polisierosite). Nello stesso lavoro la maggior parte dei ceppi non tipizzabili è stata isolata prevalentemente da casi con infezione sistemica. Questi risultati conflittuali possono essere dovuti all'elevata variabilità sia genetica sia del grado di virulenza, anche tra ceppi appartenenti allo stesso sierotipo (Blackall et al., 1996). Sulla base di queste osservazioni la classificazione di un ceppo di *H.parasuis* in un determinato sierotipo non dev'essere considerata come criterio per la valutazione della virulenza. In aggiunta a questo, i fattori ambientali, la presenza di altri patogeni batterici e virali, i trattamenti terapeutici, i trattamenti vaccinali e fattori legati all'ospite, possono giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia influenzando l'evoluzione di quest'ultima nella forma sistemica o in quella esclusivamente broncopolmonare (Angen et al., 2004).
Sulla base dell'esperienza maturata nell'attività svolta nel presente lavoro si conferma la difficoltà di isolamento del patogeno, soprattutto quando le condizioni del materiale patologico conferito non sono ottimali. Nei casi in cui non risulta possibile l'isolamento, la presenza di *H.parasuis* può essere dimostrata con l'impiego della PCR. Tuttavia, l'isolamento del patogeno rimane una condizione necessaria per l'ulteriore caratterizzazione e comparazione degli isolati, nonché per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici, per la quale esiste una grande variabilità tra ceppi isolati in aree geografiche diverse (De La Fuente et al., 2007).
Come evidenziato nei risultati, *H.parasuis* è stato isolato in concomitanza con altri agenti batterici, tuttavia non è facilmente ipotizzabile se da considerarsi come patogeno primario o secondario negli allevamenti con infezioni miste (Cai et al., 2005). Questo dato, sommato alla eventuale presenza di patogeni virali come PRRSV e PCV2, dev'essere considerato nel valutare i risultati ottenuti con la vaccinazione, soprattutto quando questa viene scelta come metodo principale di controllo della malattia (Cai et al., 2005).

BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilu somni* from pigs and cattle in Denmark. Vet. Microbiol. 101, 143-146.

2. Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. Veterinary Microbiology 103, 255-258.

3. Bak H., Riising H.J. (2002). Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. Vet. Rec. 151, 502-505.

4. Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J. (1996). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. Aust. Vet. J. 73:93–95.

5. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, 2003, pp.98-99.

6. Cai X., Chen H., Blackall P.J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M. (2005). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. Veterinary Microbiology 111, 231-236.

7. Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J. (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. J. clin. microbiol. 30, 826-865.

8. Kielstein P., Wuthe H., Angen O., Mutters R., Ahrens P. (2001). Phenotipic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenic importance. Vet. Microbiol. 81, 243-255.

9. De la Fuente A.J.M., Tucker A.W., Navas J., Blanco M., Morris S.J., Gutiérrez-Martín C.B. (2007). Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. Veterinary Microbiology 120, 184-191.

10. Del Rio M.L., Guitierrez C.B., Rodriguez Ferri e.F. (2003). Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping Haemophilus parasuis. Journal of Clinical Microbiology 23, 1022-1025.

11. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. (2001). Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn. Invest. 2001 Nov;13:495-501.

12. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary microbiology 99, 1-12.

13. Oliveira S., Blackall P. J., Pijoan C. (2003). Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. Am. J. Vet. Res. 64:435–442.

14. Olivera S., Pijoan C. (2002). Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. J Swine Health Prod 10, 221-225.

15. Rafiee M., Blackall P.J. (2000). Estabilishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Aust Vet J 78, 172-174.

16. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res. 53:659–664.

17. Rùbies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C, Espuna E. (1999). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol. 66, 245–248.

18. Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottscalk M. (2004). Development of a New Serological Test for Sertyping Haemophilus parasuis Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. Journal of Clinical Microbiology 422, 839-840.

19. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology 106,145-151.

INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI

ANIMAL HEALTH PRODUCT

> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.

dps
DryProtectiveSystem

Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE E STABILIMENTO
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT
Via Affarosa 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / *TELEPHONE:*
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

info@treivet.com
www.treivet.com

INFEZIONE CONTEMPORANEA DA SIEROTIPI 4 E 12 DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* IN UN ALLEVAMENTO SUINO

SIMULTANEOUS INFECTION BY SEROTYPES 4 AND 12 OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* IN A SWINE HERD

IODICE G.[3], LUPPI A.[1], FRANCHI L.[2], BONILAURI P[1]., MERENDA M.[1], DOTTORI M. [1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;*
[2] *Medico Veterinario, Gruppo Progeo Mangimi;*
[3] *Medico Veterinario, Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Parma.*

PAROLE CHIAVE: *Haemophilus parasuis, immunodiffusione in agar gel, sierotipo 12*
KEY WORDS: *Haemophilus parasuis*, *agar gel immunodiffusion, serovar 12*

RIASSUNTO
Nel periodo Marzo-Aprile 2009, in un allevamento suino ubicato nel nord Italia, è stato osservato un aumento delle perdite totali (morti e scarti) nella fase di post-svezzamento. L'anamnesi segnalava sintomatologia respiratoria associata a zoppie, sintomi nervosi e stati febbrili raggiungendo elevati indici di morbilità e mortalità. In seguito ad esami batteriologici eseguiti presso la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), sono stati isolati due sierotipi di *Haemophilus parasuis* tipizzati tramite immunodiffusione in agar gel ed emoagglutinazione indiretta. In particolare, due ceppi appartenenti al sierotipo 4 sono stati isolati da suini presentanti la forma sistemica (polisierosite), mentre un terzo ceppo, isolato da un suino con quadri di broncopolmonite catarrale è risultato appartenere al sierotipo 12. Questi risultati sono in accordo con la classificazione riportata da Kielstein e Rapp-Gabrielson del 1992, nella quale il sierotipo 12 viene descritto come altamente virulento ed in grado di provocare la morte in suini SPF 4 giorni dopo l'infezione, in assenza di quadri di polisierosite. Al contrario il sierotipo 4, sempre nella stessa classificazione viene inquadrato come a moderata virulenza ed in grado di provocare quadri di polisierosite, con mortalità bassa o assente. Tuttavia, la relazione tra sierotipi isolati e lesioni anatomopatologiche osservate in campo può essere soggetta ad elevata variabilità ed essere influenzata da diversi fattori (fattori legati all'ospite, vaccinazioni, coinfezioni batteriche e virali). Nel caso clinico descritto *H.parasuis* è stato riscontrato in associazione con altri patogeni come *Actinobacillus pleuropneumoniae* e PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus). I risultati di questo lavoro sottolineano l'importanza di una corretta sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* isolati, soprattutto nell'ottica di approntare idonee misure terapeutiche e soprattutto di profilassi vaccinale.

ABSTRACT
In a pig-farm of northern Italy, during March-April 2009, was observed an increasing losses in the post-weaning period. The piglets showed respiratory symptoms coupled with lameness, nervous signs and pyrexia (41°C). Two serovars of *Haemophilus parasuis* were isolated from diseased pigs in connection with routine diagnostics of Istituto Zooprofilattico of Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The strains isolated were serotyped using the agar gel immunodiffusion test and indirect haemoagglutination. Two strains isolated from pigs with systemic disease (polysierositis) belonged to serovar 4, while another strain isolated from pig with bronchopneumonia was serotyped as serovar 12. This results agreed with the classification of Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), in which the

serovar 12 has been shown to be highly virulent causing death in SPF pigs within 4 days after infection without polysierositis. In contrast, in the same classification, serovar 4 would be moderately virulent causing polysierositis and generally not death. However, the connection between serovar isolated and gross lesions observed can be influenced by several factors (host factors, vaccinations and other bacterial and viral diseases). In this work *H. parasuis* coexisted with other pathogens like *Actinobacillus pleuropneumoniae* and PRRSV. The results of this work showed the importance of isolates serotyping, mainly if the vaccination is to be used for disease protection.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è ritenuto l'agente eziologico della malattia di Glässer la quale è caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente. Batterio cosmopolita, si presenta come un coccobacillo Gram-, anaerobio facoltativo, immobile, non emolitico e dotato di spiccato polimorfismo.

Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento degli "stressors" e il concomitante sviluppo di patogeni "door opener" come il PRRSV, hanno fatto si che *H. parasuis* si ripresentasse come problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari.

A tutt'oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H.parasuis* che presentano prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, analizzando studi di sierotipizzazione dei ceppi isolati eseguiti in diversi paesi Europei, si può osservare come i sierotipi 4, 5 e 13 risultino essere i più prevalenti, mentre altri sierotipi come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrino prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Ange et al., 2004).

I 15 sierotipi di *H.parasuis* sono stati classificati in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Kielstein P. and Rapp-Gabrielson V.J., 1992). Nel primo gruppo sono stati classificati i sierotipi 1, 5, 10, 12, 13 e 14 i quali provocano forme cliniche acute caratterizzate da alta morbilità e morte entro 96 ore. Nel secondo gruppo ritroviamo i sierotipi 2, 4 e 15 che provocano, invece, la cosiddetta forma sistemica, caratterizzata da polisierosite, con una mortalità bassa o assente. Nel terzo gruppo è presente il solo sierotipo 8 il quale si limita a provocare lievi sintomi e lesioni. Infine, al quarto, appartengono i sierotipi 3, 6, 7, 9 e 11 considerati commensali delle prime vie respiratorie, che non provocano quindi né sintomatologia clinica né lesioni.

In condizioni di campo, tuttavia, i quadri clinici ed anatomopatologici provocati da un determinato sierotipo possono subire importanti variazioni. Questo si verifica perché *H.parasuis* può sovrapporsi ad infezioni virali come germe d'irruzione secondaria ovvero essere concomitante ad altre infezioni batteriche o ancora essere presente in un focolaio di malattia con più sierotipi. Considerando la diversità antigenica riconosciuta tra i vari sierotipi e l'elevata presenza di ceppi classificati come non tipizzabili si sottolinea l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* sia per studi di prevalenza, sia per la scelta di appropriate misure di controllo della malattia. In questo contesto, soprattutto quando quest'ultimo obiettivo vuole essere raggiunto con l'impiego della vaccinazione è necessario poter confrontare l'omologia tra i ceppi presenti nelle preparazioni vaccinali e quelli circolanti in allevamento. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nel valutare i possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H. parasuis*, considerando che la cross-protezione, seppur con un certo grado di variabilità, è stata dimostrata tra differenti sierotipi (Oliveira and Pijoan, 2004).

Nel presente lavoro si vogliono descrivere gli aspetti clinici ed anatomopatologici e l'iter diagnostico di un caso clinico provocato da sierotipi multipli di *H.parasuis* in un allevamento suino.

MATERIALI E METODI

Allevamento

L'allevamento oggetto del lavoro era un ciclo aperto di circa 500 scrofe con rimonta interna, organizzato in banda bisettimanale ed ubicato in un unico sito in provincia di Modena. Lo svezzamento a 28 giorni portava alla produzione di lotti di 200 suinetti che venivano allevati in salette dedicate e successivamente venduti a 110-120 giorni di vita per essere destinati all'ingrasso.

Il protocollo vaccinale adottato nell'allevamento prevedeva la vaccinazione per PCV-2 (*Porcine Circovirus type II*) e *Mycoplasma hyopneumoniae* attraverso la somministrazione di una singola dose vaccinale a 3 e a 5 settimane d'età rispettivamente. Nella scrofaia il piano vaccinale prevedeva interventi per rinite atrofica, mal rosso, parvovirosi, malattia di Aujeszky e PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*).

Sierologia ed indagini virologiche per PRRSV e PCV2

Nel periodo considerato sono state condotte sul siero di sangue di 6 animali di 8 settimane d'età, con sintomatologia clinica che descriveremo in seguito, indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi anti-PRRSV (ELISA indiretta kit IDEXX) ed anti-PCV2 (ELISA competitiva kit IZS-BS), nonché la ricerca del virus della PRRS tramite rt-PCR impiegando la metodica descritta de Bonilauri et al. (2003) e la PCR quantitativa per PCV2 seguendo il metodo indicato da Olvera et al. (2004).

Esame necroscopico

Presso la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) sono stati conferiti 7 suinetti deceduti in seguito a sintomatologia prevalentemente respiratoria. L'invio del materiale patologico è avvenuto in due distinti conferimenti, a distanza di una settimana l'uno dall'altro e della consistenza di 3 e 4 suinetti rispettivamente.

L'esame anatomopatologico è stato eseguito secondo procedure standardizzate.

Esame batteriologico

Sulla base dei rilievi anatomopatologici eseguiti sui suinetti sopraccitati, sono state condotte le indagini di laboratorio ritenute più opportune, seguendo i protocolli standardizzati presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione di Reggio Emilia. In particolare, in presenza di quadri macroscopici compatibili con una diagnosi di Malattia di Glässer, è stato applicato il protocollo diagnostico di seguito descritto. Il materiale patologico costituito da polmoni, tamponi bronchiali, tamponi di liquido pericardico e di liquido cefalorachidiano e prelievi di liquido sinoviale, sono stati utilizzati per la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con Nicotinammide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere la crescita di quei patogeni che, come l'*Haemophilus parasuis* sono per l'appunto NAD-dipendenti. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner ed in termostato a CO2 per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione la crescita di *H.parasuis* è stata confermata tramite test biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti ed ureasi negative) e morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica al microscopio ottico dopo colorazione di Gram).

Le eventuali colonie batteriche cresciute sui terreni colturali ed assimilabili per morfologia ad altri agenti patogeni (*Actinobacillus pleuropneumoniae, Streptococcus suis, Bordetella bronchiseptica, Escherichia coli, Pasteurella multocida ecc.)* sono state fenotipizzate impiegando metodi biochimici e microbiologici in uso presso la Sezione di Reggio Emilia.

Indagini biomolecolari per *H.parasuis*

Nei casi caratterizzati da lesioni anatomopatologiche compatibili con malattia di Glässer, oltre all'esame batteriologico, il protocollo diagnostico ha previsto il prelievo preventivo di campioni di polmone e pericardio che sono stati successivamente congelati e conservati a -20°C. Questo materiale è stato utilizzato nella ricerca di *H.parasuis* tramite PCR in quei casi in cui l'isolamento non ha avuto successo. La PCR sopraccitata è stata eseguita tramite la metodica descritta da Olivera et al. nel 2001, impiegando i primer HPS1_F 5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3' e HPS2_R 5'-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3'.

Sierotipizzazione di *H.parasuis*

Il protocollo di sierotipizzazione ha previsto l'impiego di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13, scelti ed acquistati presso il Gallant Custom Laboratory (Canada) sulla base di dati di prevalenza raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi paesi a livello mondiale (Blackall et al., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliviera et al., 2003; Angen et al., 2004; Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Cai et all., 2005.).

Le prove di sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* isolati sono state eseguite tramite immunodiffusione in gel di agar (AGID). La procedura impiegata ha previsto le fasi riportate di seguito (Rafiee M. and Blackall P.J. 2000):

- Il ceppo di *H.parasuis* da sierotipizzare è stato seminato su 2 piastre di agar sangue addizionate con NAD ed incubato in termostato a CO2 a 37°C per 48 ore. Successivamente, valutata la crescita in purezza del batterio, ogni piastra è stata lavata con 1,5 ml di PBS, eseguendo inoltre una delicata spatolatura.
- la soluzione ottenuta è stata sottoposta a trattamento termico in autoclave ad una temperatura di 120°C per 90 minuti, necessario per l'eliminazione degli antigeni termolabili.
- dopo il trattamento termico la soluzione è stata centrifugata a 2000 giri per 10 minuti per sedimentare le particelle più grossolane sul fondo della provetta e procedere successivamente al prelievo del surnatante contenente l'antigene da impiegare nella sierotipizzazione.

La sierotipizzazione è stata quindi eseguita utilizzando piastre di agar gel in cui sono state praticate una serie di quattro "rosette" di fori, ognuna composta da un foro centrale e sei fori periferici, idonei ad ospitare rispettivamente 35 μl di siero positivo di referenza e 6 antigeni di cui 5 in esame ed uno di referenza (controllo positivo), omologo al siero positivo impiegato.

Le piastre sopracitate sono state incubate a temperatura ambiente e la lettura è stata eseguita a 36, 48, 72 ore andando a valutare l'eventuale formazione di una banda di precipitazione tra il pozzetto contenente l'antigene in esame e l'antisiero noto corrispondente.

I ceppi isolati sono stati inoltre sierotipizzati presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory (IVD GmbH) di Hannover, impiegando una metodica di emoagglutinazione indiretta come descritto da Turni e Blackall nel 2005.

RISULTATI

Rilievi clinici

Come accennato brevemente in precedenza, nell'allevamento in esame si era verificato un aumento delle perdite totali nella fase di post-svezzamento che, tra decessi e scarti, raggiungevano circa il 9-10%. Il quadro clinico era caratterizzato prevalentemente da sintomi respiratori, presenti nel 20% circa degli animali tra 7 e 12 settimane d'età. In diversi animali, inoltre, si osservava zoppia con quadri riconducibili ad artrite tarsica e carpica. Era presente inoltre sintomatologia nervosa e febbre fino a 41°C.

Sierologia ed indagini virologiche per PRRSV e PCV2
I risultati delle indagini sierologiche e virologiche per PRRSV e PCV2 sono riassunti in tabella 1.

Tabella 1: Risultati delle indagini sierologiche e biomolecolari per PRRSV e PCV2 eseguite sul siero di sangue di sei suini con sintomatologia clinica, durante il focolaio oggetto del lavoro.
Tabole1: PRRSV and PCV2 serological and PCR results on six diseased pig sera, belonging to the herd described in this study.

Campione	PRRS Elisa Ab S/P	PCV2 ELISA Ab	Rt-PCR PRRSV	Real time PCR PCV2
1	1,0	1/100	1 pool positivo ceppo Europeo	Negativa
2	1,8	1/100		Negativa
3	1,9,	1/100		Negativa
4	2,1	1/100	Negativa	Negativa
5	2,4	1/100		Negativa
6	2,5	1/100		Negativa

Esame necroscopico
L'esame anatomopatologico eseguito sui 3 suinetti del primo conferimento ha mostrato quadri di pleurite e pericardite fibrinosa associati ad artrite fibrinosa localizzata al tarso e al carpo dei quattro arti nel primo animale, di broncopolmonite catarrale purulenta ai lobi apicali in forma bilaterale nel secondo e pericardite fibrinosa con pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica associata a quadri di polmonite interstiziale nel terzo.
Sulle 4 carcasse facenti parte del secondo conferimento, invece, si sono evidenziati rispettivamente quadri macroscopici di broncopolmonite catarrale localizzata ai lobi apicali nel primo, di pleurite, pericardite, perisplenite e periepatite di tipo fibrinoso nel secondo e di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica associata a quadri di pericardite, perisplenite e periepatite fibrinosa nel terzo. Nel quarto animale conferito erano assenti lesioni anatomopatologiche all'apparato respiratorio, così come a livello degli altri apparati.
Ad eccezione delle lesioni descritte, in entrambe i conferimenti non si evidenziavano altri quadri patologici macroscopici a livello di altri apparati o organi.

Esame batteriologico
L'esame batteriologico eseguito sul materiale patologico prelevato dai suini del primo conferimento ha permesso l'isolamento di un ceppo di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, tipizzato come biotipo 2 sierotipo 7, mentre pur in presenza di lesioni riferibili ad infezione da *H.parasuis*, non è stato possibile l'isolamento del patogeno. Nel secondo conferimento, tuttavia, l'isolamento di *H.parasuis* è stato ottenuto da 3 suini su 4, in due casi in presenza di lesioni riferibili a malattia di Glässer e in un caso, da lesioni esclusivamente caratterizzate da broncopolmonite catarrale (tabella 2). Nel secondo conferimento, inoltre, è stato isolato un ceppo di *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 sierotipo 9.
I risultati delle indagini batteriologiche, per i due conferimenti sopraccitati, sono riassunti in tabella 2.

Indagini biomolecolari per *H.parasuis*
In seguito all'insuccesso nell'isolamento di *H.parasuis* da lesioni anatomopatologiche

caratteristiche di polisierosite osservate nei suinetti facenti parte del primo conferimento, si è proceduto alla ricerca dell'agente eziologico sopraccitato tramite PCR da campioni di polmone e pericardio, prelevati come da protocollo diagnostico precedentemente descritto. Attraverso questo metodo analitico è stata dimostrata la presenza dell'agente eziologico nei campioni 1 e 3 descritti in tabella 2.

Sierotipizzazione di *H.parasuis*

I ceppi di *H.parasuis* isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione con le modalità descritte in precedenza. L'applicazione di questa metodica ha permesso di classificare i ceppi isolati come sierotipo 4, isolato da due suini presentati la forma sistemica (polisierosite fibrinosa) e sierotipo 12, isolato da polmoni di suino presentanti esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale.

I risultati della sierotipizzazione tramite immunodiffusione in agar gel sono stati confermati tramite il test di emoagglutinazione indiretta.

Tabella 2: Lesioni anatomo-patologiche e risultati dell'esame batteriologico eseguito sui sette suini conferiti presso IZSLER, sezione di Reggio Emilia.
Table 2: Gross lesions and bacteriological results on seven tested pigs sent to the IZSLER, Reggio Emilia laboratory.

Campione	Lesioni anatomopatologiche	Esame batteriologico
1	Pleurite, pericardite e artrite fibrinosa	Negativo
2	Broncopolmonite catarral-purulenta	Negativo
3	Pericardite fibrinosa, pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, polmonite interstiziale	*Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2 sierotipo 7
4	Broncopolmonite catarrale	*Haemophilus parasuis* sierotipo 12
5	Pleurite ,pericardite, periepatite e perisplenite fibrinosa	*Haemophilus parasuis* sierotipo 4
6	Pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, pericardite, perisplenite e periepatite fibrinosa	*Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 sierotipo 9 *Haemophilus parasuis* sierotipo 4
7	Assenti	Negativo

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Analizzando i risultati ottenuti nel presente lavoro sono diversi gli argomenti che necessitano di essere sottoposti a discussione.

In primo luogo occorre sottolineare le difficoltà che si riscontrano nell'isolamento di *H.parasuis* anche da lesioni anatomopatologiche ritenute patognomoniche. Sulla base

dell'esperienza maturata è possibile affermare che le probabilità di isolare con successo il patogeno sono fortemente influenzate dallo stato di conservazione dei campioni patologici. Pertanto più ci si allontana, in termini temporali, dal momento della morte dell'animale più si abbassano le probabilità di isolamento di *H.parasuis*. Inoltre, evenienze comuni come gli stress termici subiti dai campioni ed i trattamenti antibiotici effettuati sugli animali aumentano le probabilità di insuccesso dell'esame batteriologico.
L'applicazione di un iter diagnostico che preveda il prelievo preventivo di materiale patologico da destinare alla ricerca di *H.parasuis* tramite PCR, nei casi di mancato isolamento del patogeno, può ovviare in parte all'insuccesso dell'esame batteriologico. Tuttavia, come descritto precedentemente, l'isolamento di *H.parasuis* rimane una condizione indispensabile per la successiva sierotipizzazione. Questa assume un ruolo tutt'altro che marginale, considerando l'importanza che la conoscenza del sierotipo circolante in un determinato allevamento ha nella scelta di appropriate misure terapeutiche e di profilassi vaccinale. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nella valutazione dei possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H.parasuis*. In questo contesto, infatti, occorre considerare l'omologia tra i sierotipi presenti nei vaccini e quelli circolanti in allevamento ed inoltre che la cross-protezione, seppur con un certo grado di variabilità, è stata dimostrata tra ceppi appartenenti a sierotipi diversi (Bak and Riising, 2002; Oliveira and Pijoan, 2004).
Un altro aspetto che merita di essere sottolineato riguarda la contemporanea presenza di due diversi sierotipi di *H.parasuis* nell'ambito del medesimo focolaio di malattia. In particolare la presenza del sierotipo 12 suscita ulteriore interesse in quanto relativamente meno frequente rispetto ad altri sierotipi come il 4, il 5 ed il 13 che diversi autori descrivono come prevalenti in numerosi paesi (Blackall et al., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliveira et al., 2003; Angen et al., 2004; Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Cai et all., 2005.). Il sierotipo 12, al contrario, viene descritto con prevalenze del 7% e 8% in Stati Uniti e Canada rispettivamente (Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Tadjine et al., 2004) e del 3% in Australia, Germania, Spagna e Danimarca (Blackall et al. 1996, Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Angen et al., 2004;).
Si sottolinea inoltre come i due ceppi di *H.parasuis* appartenenti al sierotipo 4 siano stati isolati da suini presentanti la forma sistemica della malattia (polisierosite) mentre il sierotipo 12 da un suino con lesioni confinate esclusivamente all'apparato respiratotio e caratterizzate da broncopolmonite catarrale. Questo appare in accordo con quanto riportato da Kielstein P. e Rapp-Gabrielson V.J. nel 1992, nello schema di classificazione dei sierotipi sulla base del grado di virulenza in suini SPF, già descritto nell'introduzione del lavoro.
Infine appare importante sottolineare la presenza, in un contesto di malattia sostenuta da *H.parasuis,* di altri agenti patogeni di estrema importanza come il virus della PRRS e l'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.
In conclusione, nel presente lavoro è evidente l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis,* la quale fornisce informazioni precise da utilizzare nella scelta di appropriate misure di controllo della malattia. Questo dato, sommato alla eventuale presenza di altri patogeni batterici e virali dev'essere considerato nel valutare i risultati attesi con la vaccinazione, soprattutto quando questa viene scelta come metodo principale di controllo della malattia.

RINGRAZIAMENTI
Si ringrazia il Dr. Maurizio Cesabianchi, National Veterinary Manager Swine, Pfizer, per la collaborazione nell'attività di sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis*.

BIBLIOGRAFIA

1. Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. Veterinary Microbiology 103, 255-258.

2. Bak H., Riising H.J. (2002). Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. Vet. Rec. 151, 502-505.

3. Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J. (1996). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. Aust. Vet. J. 73:93–95.

4. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, 2003, pp.98-99.

5. Cai X., Chen H., Blackall P.J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M. (2005). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. Veterinary Microbiology 111, 231-236.

6. Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J. (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. J. clin. microbiol. 30, 826-865.

7. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. (2001). Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn. Invest. 2001 Nov;13:495-501.

8. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary microbiology 99, 1-12.

9. Oliveira S., Blackall P. J., Pijoan C. (2003). Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. Am. J. Vet. Res. 64:435–442.

10. Rafiee M., Blackall P.J. (2000). Estabilishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Aust Vet J 78, 172-174.

11. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res. 53:659–664.

12. Rùbies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C, Espuna E. (1999). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol. 66, 245–248.

13. Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottscalk M. (2004). Development of a New Serological Test for Sertyping Haemophilus parasuis Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. Journal of Clinical Microbiology 422, 839-840.

14. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology 106,145-151.

IDIOPATHIC VESICULAR DISEASE (IVD): SEGNALAZIONE DI UN CASO IN UMBRIA

IDIOPATHIC VESICULAR DISEASE (IVD): A CASE REPORT IN UMBRIA REGION

SENSI M.[1], CATALANO A.[2],SALVATORI-FRANCHI F.[2], TINARO M.[1], PANZIERI C.[1], MARCHI S.[1], MARIOTTI C.[1], PECORELLI I.[1], ORSINI S.[1], COSTARELLI S.[1]

[1]Istituto Zooprofillatico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche;
[2]ASL 2 Perugia, Distretto del Trasimeno;

Parole chiave: lesioni vescicolari, suini, ipotesi diagnostica
Key words: vesicular lesions, pigs, diagnostic hypothesis

RIASSUNTO
Nel periodo ottobre 2008 – aprile 2009, si sono verificati più di trenta focolai di Malattia Vescicolare del Suino, nel territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Nello stesso periodo, sono state osservate lesioni simil-vescicolari sul grugno di suini all'ingrasso, in un allevamento ubicato all'interno di una delle zone di sorveglianza per MVS. Venne immediatamente sospettato un altro episodio di Malattia Vescicolare ma il sopralluogo in allevamento ed i successivi esami di laboratorio hanno permesso di escludere la presenza di Malattia Vescicolare del Suino (MVS) ed hanno aperto il campo ad una nuova interessante ipotesi diagnostica**.**

ABSTRACT
During the period october 2008 – april 2009, more then thirty outbreaks of Swine Vesicular Disease (SVD) were registered in Umbria region. Along the same time, in a fattening herd, vesicular lesions on snout were observed in some pigs. Due to the type of lesions and the epidemiological territorial reality, the Local Veterinary Service immediately suspected another Swine Vesicular Disease (SVD) outbreak onset. The farm visit and successive laboratory investigations ruled out SVD infection and open new interesting diagnostic hypothesis.

INTRODUZIONE
Nell'ottobre 2008 in Umbria si sono verificati numerosi focolai di Malattia Vescicolare del Suino (MVS) che hanno portato alla sospensione dell'accreditamento della Provincia di Perugia. L'ultimo focolaio è stato individuato nel mese di Marzo in località Montecchio, nel Comune di Tuoro sul Trasimeno (PG), con conseguente emanazione delle ordinanze di Zona di Protezione e Zona di Sorveglianza. Nello stesso periodo, in un allevamento da ingrasso, sito all'interno della Zona di Sorveglianza, in occasione della visita clinica ai fini della movimentazione per la macellazione, venivano osservate, in alcuni animali, lesioni vescicolari sul grugno. La presenza delle lesioni e la particolare situazione epidemiologica del territorio ha fatto immediatamente temere l'insorgenza di un ennesimo focolaio di MVS. Il sopralluogo ed i successivi accertamenti analitici hanno permesso di escludere l'infezione da Malattia Vescicolare ed aperto nuove ed interessanti ipotesi diagnostiche.
Scopo del presente lavoro è di descrivere l'episodio ed illustrare le modalità con le quali si è arrivati ad emettere diagnosi di Idiopathic Vesicular Disease (IVD) del suino.

MATERIALI E METODI

Nella terza decade di Aprile 2009, in un allevamento sito in località Pieracci di Castiglione del Lago, all'interno di una Zona di Sorveglianza per Malattia Vescicolare Suina, il veterinario ASL competente per territorio, in occasione della visita clinica obbligatoria ai fini della movimentazione in deroga per il macello, notava lesioni simil-vescicolari sulla parte superiore del grugno in un elevato numero di soggetti.
Immediata è stata la comunicazione alle autorità competenti le quali hanno predisposto le misure di sequestro cautelativo dell'allevamento.
L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale territoriale, in collaborazione con i colleghi della ASL, ha effettuato il sopralluogo e la relativa indagine epidemiologica. In quest'occasione sono stati effettuati prelievi ufficiali di sangue e di feci per la conferma del sospetto di Malattia Vescicolare.
A distanza di due giorni è stato effettuato un ulteriore sopralluogo in azienda.
Nel corso di questo secondo sopralluogo sono stati prelevati 16 campioni di sangue, in toto ed in EDTA, dagli animali che presentavano le lesioni più evidenti. Sono stati prelevati n° 5 campioni di mangime da 4 mangiatoie e dal silos e scattate alcune fotografie (foto 1, 2, 3, 4).
E' stata rilevata, inoltre, la temperature corporea a 12 soggetti (con lesioni e non).
I campioni di sangue sono stati sottoposti ad accertamenti chimico-clinici, emocromocitometrici e alla valutazione della formula leucocitaria: Dai mangimi è stata effettuata la determinazione della concentrazione di Aflatossine, di Deossinilvalenolo (Vomitossina), di Zearalenone, di Fumonisina e Tossina T2.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Le lesioni, rilevate in circa il 20% dei suini dell'allevamento erano localizzate sul grugno e/o sulla sua parte dorsale. In alcuni soggetti erano presenti anche sulla lingua (Fig.1) e nella zona gengivale; assenti in corrispondenza del cercine coronario. Il loro aspetto era irregolare per forma (circolari, a "V", a semiluna) (Fig. 2), delle dimensioni di circa 3-4 millimetri e prevalentemente di colore ambrato.

Fig. 1 Lesioni sulla lingua "V" su grugno
Fig. 1 Tongue lesions lesions

Fig. 2 Lesioni a
Fig. 2 "V"

Nessuno degli animali controllati, (con e senza lesioni), presentava rialzo febbrile (T° 38,5 – 39,3).
Il mangime utilizzato era stato acquistato dal commercio e, a detta del proprietario dell'allevamento, non molto appetito dagli animali.
L'indagine epidemiologica aveva evidenziato che erano rispettate le principali norme di

biosicurezza. L'ultimo ingresso di animali risaliva ai primi di settembre 2008 e l'ultima uscita per il mattatoio nel dicembre 2009.
I campioni di sangue, prelevati dal Servizio Veterinario della ASL durante il primo sopralluogo, sono stati sottoposti a test ELISA di screening per Malattia Vescicolare Suina presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Un'aliquota degli stessi campioni di sangue ed i campioni di feci sono state inviati all'Istituto Zooprofilattico di Brescia per gli accertamenti sierologici e virologici nei confronti del virus aftoso. Tutti i campioni hanno dato esito negativo sia per MVS che per Afta epizootica.

I risultati dei parametri chimico-clinici non hanno evidenziato particolari alterazioni degne di nota.

I livelli di micotossine rilevati, riportati nella Tabella 1, non sono tali da giustificare la sintomatologia clinica presente, anche se la concentrazione di Fumonisina e di Vomitossina (DON) in alcuni campioni potrebbe acquisire una certa significatività.

Tab. 1 Esiti dei controlli per micotossine effettuati sul mangime
Table 1 Mycotoxines levels revealed in the feed

Reparto	**Aflatossine B e G mg/Kg**	**DON mg/Kg**	**FB1 mg/Kg**	**T – 2 mg/Kg**	**Zearalenone mg/Kg**
Cap. B b.4	0,002	0,37	4,82	0,047	<0,02
Cap. B b.3	<0,002	0,39	5,62	0,050	0,03
Cap.D b.E	<0,002	1,18	5,20	0,065	<0,02
Cap. D b.4	<0,002	0,89	6,40	0,052	0,03
Silos B	0,002	0,46	6,85	0,061	<0,02

Nel passato, tuttavia, sono stati riportati casi, di suini in accrescimento (magroncelli), in cui la comparsa di piccole vescicole, localizzate prevalentemente sul grugno e nel cavo orale, era dovuta alla contemporanea presenza di tossina T-2 (che ha una potente azione irritativa del derma e della mucosa del cavo orale), di vomitossina e fumonisina (8).
Negli ultimi due anni, abbiamo avuto modo di rilevare manifestazioni cliniche simili, in altri due diversi allevamenti umbri, sempre nel periodo primaverile. Nel primo evidenziammo livelli elevati di DON e Zearalenone nell'alimento, mentre nel secondo registrammo l'inclusione di un prodotto acidificante, in concentrazione eccessiva, nel mangime utilizzato.
Alla luce di quanto descritto e delle esperienze di campo avute, riteniamo di poter ipotizzare che l'episodio patologico da noi osservato possa essere ricondotto a quella forma morbosa che viene definita Malattia Vescicolare Idiopatica (IVD) che, sporadicamente, può manifestarsi all'interno di allevamenti di suini.
Questa malattia, segnalata anche in Australia, Nuova Zelanda e Stati Uniti d'America (1,3,9), ha un andamento stagionale con picco di frequenza nel periodo che va dalla primavera all'autunno.
Pur non essendo una patologia debilitante per l'animale colpito né economicamente pesante per l'allevatore, l'IVD ha un significato diagnostico differenziale di fondamentale importanza (2), in quanto la sintomatologia clinica da essa sostenuta, è perfettamente sovrapponibile a quella indotta dal virus della Malattia Vescicolare del Suino, dell'Afta Epizootica, e delle altre malattie vescicolari inserite nella Lista dell'OIE.
In sede di diagnosi differenziale, devono essere prese in considerazione anche l'infezione da Enterovirus del suino del gruppo III (5), la Parvovirosi (4, 6, 7), l'infezione da Calicivirus,

le micotossicosi (soprattutto da T–2), e la fotodermatite da furocumarina a seguito dell'assunzione di cataboliti del fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.
Non va tuttavia trascurato l'intervento di "fattori predisponenti" insiti nella realtà di allevamento. In questa circostanza, infatti, la particolare natura del dispositivo di abbeverata, costituito da un "ciucciotto ad alta pressione" con punta particolarmente sottile, inserito all'interno della mangiatoia ("mangia e bevi"), potrebbe aver contribuito ad aggravare e complicare il quadro sintomatologico. Gli animali, infatti, costretti a premere con il grugno su questo dispositivo potrebbero essersi procurate delle irritazioni e delle escoriazioni che in alcuni casi simulavano la rottura di vescicole (fig. 4).

Fig. 3 Mangiatoia con abbeveratoi
Fig. 3 Hopper with nipple-drinkers

Fig. 4 Vescicole aperte
Fig. 4 Opened vesicles

Tutto ciò ha contribuito ad aggravare la manifestazione clinica di IVD, di per sé stessa allarmante, soprattutto in un periodo in cui tutti gli sforzi del Servizio Sanitario Umbro erano tesi alla riacquisizione dell'indennità da Malattia Vescicolare del Suino dopo i focolai verificatisi nell'autunno 2008 - primavera 2009.

BIBLIOGRAFIA

1. Gibbs EPJ, Stoddard HL, Yedloutchnig RJ, House JA, Legge M, (1983) A vesicular disease of pigs in florida of unknown etiology. Florida Vet J 1983; 12:25-27.
2. Montgomery JF, Oliver RE, Poole WSH. A (1987) Vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease. I. field cases. NZ Vet J 1987;35.21-26.
3. Amass SF, Schneider JL, Miller CA, Shawky SA, Stevenson GW, Woodruff ME. (2004) Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. J Swine Health prod 2004;12(4):192-196.
4. Kresse JL, Taylor WD, Stewart WW, Eernisee KA. (1985) Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. Vet Microbiol 1985;10:525-531.
5. Knowles NJ. (1988) The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. Vet Rec 1988;122:441-442.
6. Lager KM, Mengeling WL. (1994) Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. J Vet Diagn Invest 1994;6:357-359.
7. Whitaker HK, neu SM, Pace LW. (1990) Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. J Vet Diagn Invest 1990;2:244-246.
8. Osweiler GD. Mycotoxins. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire SD, Taylor DJ, (2006) eds. Diseases of Swine. 9th ed. Ames: Blackwell publ, 2006:915-929.
9. Pasma T, Davidson S, Shaw SL. (2008) Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. CVJ/Vol49/January 2008.

PRRSV IN CAMPIONI DI FLUIDO ORALE: STUDIO LONGITUDINALE IN CONDIZIONI DI CAMPO.

DETECTION OF PRRSV IN ORAL FLUID SAMPLES: LONGITUDINAL STUDY UNDER FIELD CONDITIONS.

GRADASSI M., PAVESI R., BONIOTTI B., NASSUATO C., GIOVANNINI S., GIACOMINI E., BELLINI S., PACCIARINI M., ALBORALI L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: PRRSV, fluido orale, RT-PCR, suino
Key words: PRRSV, oral fluid, RT-PCR, pig

RIASSUNTO
Il controllo della PRRS in allevamento è un percorso complesso che si deve avvalere di diverse misure ed interventi e che, a causa dell'elevato numero di campioni diagnostici necessari, risulta spesso oneroso. La scelta del fluido orale quale matrice diagnostica sembra oggi rappresentare una promettente alternativa al siero. Scopo di questo lavoro è stato quello di monitorare l'infezione da PRRSV in allevamento attraverso un campionamento longitudinale di sieri, secondo i protocolli diagnostici normalmente in uso, e di confrontare i risultati ottenuti con le indagini effettuate su campioni collettivi di saliva. I nostri risultati, sebbene preliminari, suggeriscono che la sensibilità relativa del test qRT-PCR su fluido orale rispetto al gold standard, PCR individuale su siero, può essere considerata soddisfacente.

ABSTRACT
PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) control in swine farms is an ambitious challenge that has to be based on different measures and intervention plans and that, because of the high amount of diagnostic samples required, is often cost prohibitive. The selection of oral fluid as diagnostic specimen is likely to be a promising alternative to serum. The main purpose of the present experimental study was to monitor PRRSV infection towards a longitudinal sampling of sera, according to the traditional diagnostic protocols, and to match sera with collective pen-based oral fluid results. The preliminary data presented here suggests that the diagnostic sensitivity of the quantitative RT-PCR on oral fluids, compared to the gold standard (RT-PCR on individual serum samples), can be accounted as satisfactory.

INTRODUZIONE

La PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) è stata descritta per la prima volta in USA nel 1987 e, nel giro di pochi anni, è diventata pandemica. Tale sindrome è sostenuta dal PRRSV, virus attualmente classificato come ordine *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae* e genere *Arterivirus*. Una delle principali caratteristiche del virus della PRRS è la sua spiccata variabilità: si riscontrano infatti differenze sempre più significative a livello genomico fra i diversi ceppi, in particolare fra quelli che rientrano all'interno del genotipo europeo (Cay *et al*., 2008). Cruijsen *et al*., 2008, hanno osservato che diversi ceppi possono circolare in modo diverso in diversi allevamenti; un determinato ceppo virale può circolare all'interno di un azienda in una sola fascia d'età e per un breve tempo, quando in un'altra azienda lo stesso

ceppo può persistere per tempi più lunghi ed interessare più fasce della popolazione.
Il controllo della PRRS in allevamento è un percorso complesso che si deve avvalere di diverse misure ed interventi; fra gli strumenti principali ricordiamo la gestione aziendale ed in particolare dei gruppi, la vaccinazione, l'acclimatamento, l'applicazione di severe misure di biosicurezza, un programma di controllo attraverso test diagnostici di conferma. Il protocollo diagnostico generalmente adottato si avvale di test sierologici (ELISA) e di esami diretti quali test di biologia molecolare (RT-PCR); tale iter diagnostico può risultare spesso oneroso a causa dell'elevato numero di campioni necessari per il monitoraggio dei diversi gruppi di suini. Si sente oggi l'esigenza di individuare nuove strategie di monitoraggio, che si avvalgano o di pool di campioni di sangue o di matrici alternative rappresentative di gruppi di animali.
La scelta del fluido orale è già praticata in medicina umana (Parry *et al*., 1987; Anon., 1996; Brandtzaeg, 2007; Lima *et al*., 2009) e sembra oggi rappresentare un alternativa promettente anche nel settore suinicolo. Il "fluido orale" è costituito dall'associazione di saliva e trasudato mucosale. Mentre quest'ultimo origina dalla mucosa buccale e gengivale e contiene anticorpi siero-derivati, la saliva è prodotta dalle ghiandole parotide, sottomandibolare e sublinguale, oltre che da ghiandole minori (Humphrey e Williamson, 2001; McKie *et al*., 2002; Prickett *et al*., 2008).
Il monitoraggio dell'infezione da PRRSV in allevamento per mezzo della saliva è stato oggetto di studi sia in condizioni sperimentali (Prickett *et al*., 2008a) che di campo (Hoffman *et al*., 2008; Prickett *et al*., 2008b). Prickett *et al*., 2008 hanno dimostrato sperimentalmente che PRRSV è presente nei campioni di fluido orale per circa 4 settimane post-infezione (PI) suggerendo quindi una periodicità di campionamento inferiore a 28 giorni.
Scopo di questo lavoro è quello di monitorare l'infezione da PRRSV in allevamento attraverso un campionamento longitudinale di sieri, secondo i protocolli diagnostici normalmente in uso, e di confrontare i risultati ottenuti con le indagini effettuate su campioni collettivi di saliva.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Sono state selezionate 4 aziende positive per PRRSV con caratteristiche produttive simili.
Azienda 1: azienda a ciclo aperto di 800 scrofe
Azienda 2 : azienda a siti di 1800 scrofe
Azienda 3 : azienda a siti di 2100 scrofe
Azienda 4 : azienda a siti di 1900 scrofe
In ogni azienda sono stati selezionati 4 gruppi di circa 30 – 40 suinetti al momento dello svezzamento distribuiti in differenti box al'interno dello stesso capannone. In ogni gruppo sono stati identificati singolarmente con marca auricolare 10 soggetti e numerati da 1 a 40.

Protocollo di campionamento

I campioni di sangue sono stati prelevati dai singoli suinetti identificati a partire dal giorno dello svezzamento previsto nelle 4 aziende a 21-25 giorni di vita (T0). Hanno fatto seguito altre 3 sessioni con cadenza bi-settimanale, a 5 (T1), 7 (T2) e 9 settimane di vita (T3). Tali campioni, all'arrivo in laboratorio, sono stati centrifugati a 1400 x g per 10 minuti, divisi in aliquote e conservati a – 80°C.
I campioni di fluido orale sono stati raccolti durante le medesime sessioni di prelievo attraverso l'ausilio di una fune in cotone del diametro di 18 mm. Le dimensioni della fune

si sono dimostrate idonee ad esclusione del primo campionamento in quanto i suinetti di 21-25 gg mostravano scarso interesse e difficoltà nel mordere la fune. Per ovviare a tale problema, si è stabilito, in occasione del solo primo prelievo, di sfrangiare una delle estremità della corda al fine di rendere più agevole la suzione del materiale di raccolta. Una fune di lunghezza di 40-50 cm veniva quindi appesa alle barre del box in modo da raggiungere l'altezza delle spalle dei suini e veniva lasciata a disposizione dell'intero gruppo per 60 minuti circa. I suini si sono dimostrati attratti dalla fune e durante l'intero tempo di esposizione hanno depositato il fluido orale. L'operatore utilizzando guanti sterili e sostituendoli per ogni gruppo procedeva a recuperare la fune dall'esterno del box, senza entrare in contatto con i suini e a porla all'interno di un sacchetto sterile precedentemente identificato.
All'arrivo in laboratorio, le funi sono state trattate singolarmente con materiale sterile monouso e sottoposte a compressione manuale per permettere il recupero del fluido orale. I campioni di saliva così ottenuti sono stati conservati in congelatore a – 80°C.

Indagini di laboratorio

Al termine delle prove eseguite in ogni azienda tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti alle indagini di laboratorio .Nella tabella sottostante dettagliamo gli esami di laboratorio previsti per la ricerca PRRSV nelle diverse matrici.

TABELLA 1: INDAGINI DI LABORATORIO.
TABLE 1: LABORATORY EXAMS.

Matrice	RT-PCR singoli (1-40)	RT-PCR pool-box
Sangue	**x**	
Fluido orale		**x**

I campioni di siero sono stati analizzati singolarmente; i campioni di fluido orale sono considerati pool in quanto rappresentativi dell'intero gruppo di suini presenti nel box.
La presenza di *PRRSV* è stata dimostrata tramite tecniche di biologia molecolare. In particolare è stata utilizzata una metodica RT-PCR quantitativa avvalendosi del Kit TaqMan NA/EU PRRSV dell'Applied Biosystem.
Sensibilità del test su fluido orale

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata la sensibilità relativa della metodica PCR su saliva rispetto alla PCR su siero individuale. Al fine di individuare la sensibilità di tale test i risultati delle differenti aziende e dei diversi gruppi sono stati considerati unitariamente mantenendo la suddivisione per settimane di vita.

RISULTATI

I grafici di seguito riportati permettono di visualizzare la media dei valori quantitativi dei soggetti qRT-PCR positivi (n°10) per gruppo (A, B, C, e D) e per campionamento (3, 5, 7 e 9 settimane d'età) e l'esito quantitativo della RT-PCR su fluido orale:

Azienda 1: tutti i campioni di siero e di saliva raccolti a 3, 5 e 7 settimane si sono dimostrati PRRSV positivi tramite tecnica RT-PCR. La PCR su siero individuale è indicativa di un aumento di percentuale di positivi dalle 3 alle 5 settimane e di una progressiva diminuzione dalla quinta alla settima. A 9 settimane i gruppi B, C e D, negativi alla PCR su siero si sono dimostrati positivi al solo fluido orale.

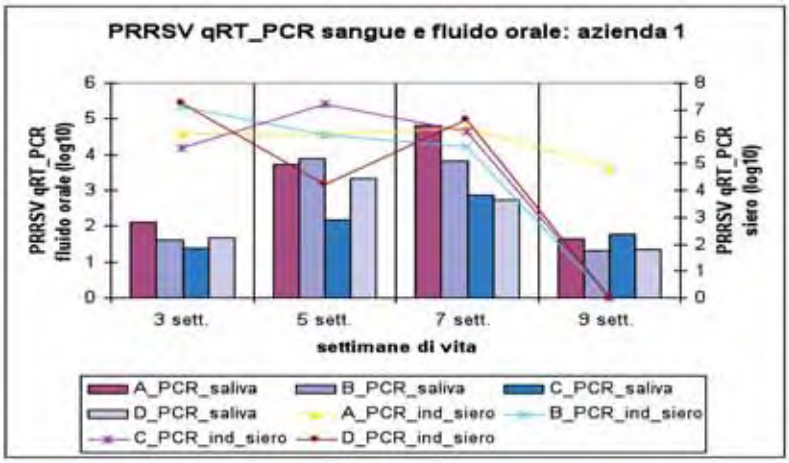


GRAFICO 1: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 1.
GRAPHIC 1: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 1.

Azienda 2: i campioni di siero appartenenti ai gruppi A e B sono risultati positivi a PRRSV alla 3° settimana di vita mentre i gruppi C e D a partire dalla 5° settimana. Tutti i gruppi si sono mantenuti positivi alla 7 mentre solo i gruppi B e C fino alla 9 settimana. Per quanto riguarda il fluido orale è stata osservata una totale corrispondenza ad eccezione del gruppo B a 9 settimane.

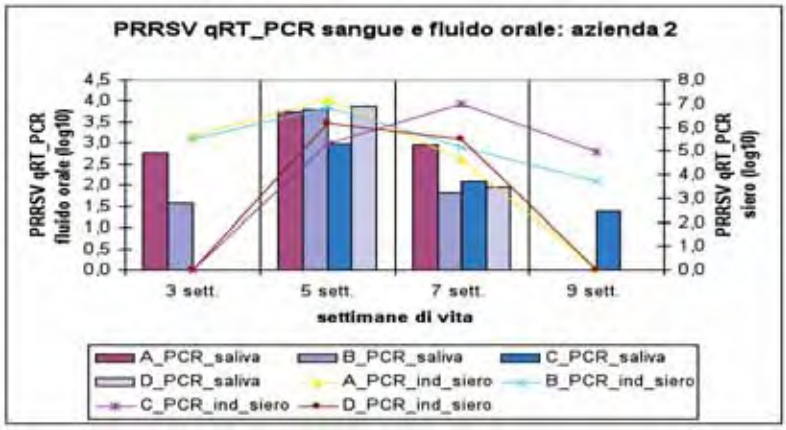


GRAFICO 2: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 2.
GRAPHIC 2: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 2.

Azienda 3: i campioni di siero dei 4 gruppi sono risultati positivi alle settimane 5 e 7 mentre i gruppi A e B hanno evidenziato positività già a partire dalla 3°. Alla 9 settimana tutti i gruppi erano negativi. Il fluido orale è risultato positivo a partire dalla 5° settimana per poi risultare negativo alla 9°.

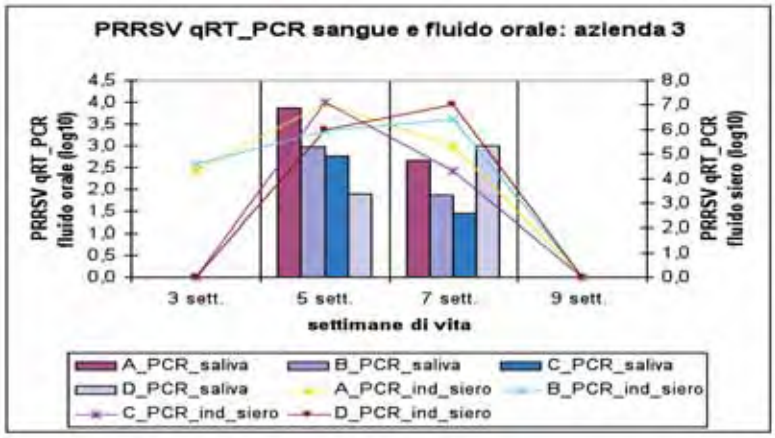


GRAFICO 3: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 3.
GRAPHIC 3: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 3.

Azienda 4: I campioni di siero sono risultati positivi a partire dalla 5° settimana e sono rimasti tali fino alla 9°. Anche i campioni di fluido orale hanno seguito lo stesso andamento ad eccezione del campione del gruppo C che è risultato positivo per la prima volta alla 7 settimana.

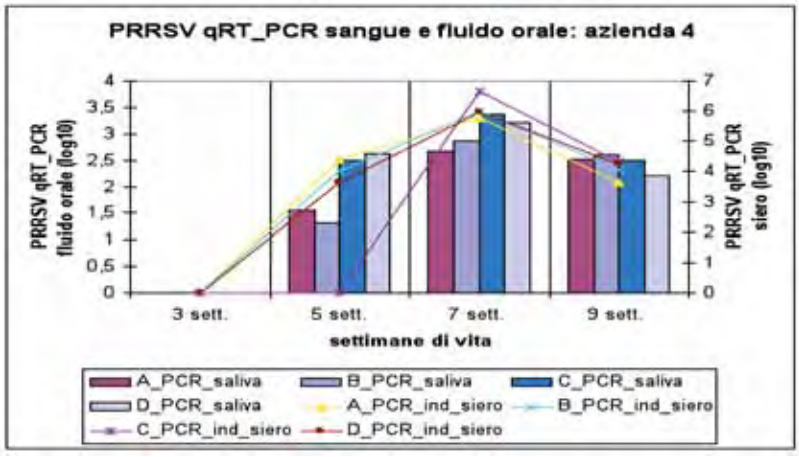


GRAFICO 4: PRRSV QRT-PCR SU SANGUE E FLUIDO ORALE, AZIENDA 1.
GRAPHIC 4: PRRSV QRT-PCR ON SERUM AND ORAL FLUID, FARM 4.

Sensibilità del test su fluido orale
Di seguito viene riportata la Tabella descrittiva della sensibilità relativa del test diagnostico eseguito su saliva rispetto alla PCR su siero individuale considerata gold standard.

TABELLA 2: QRT-PCR DIAGNOSTIC SENSITIVITIVE.
TABLE 2: QRT-PCR DIAGNOSTIC SENSITIVITY.

3 settimane di vita		
% positivi	**Se**	**FNR**
50 (28-72)	0,75 (0,43-0,95)	0,25 (0,03-0,65)
5 settimane di vita		
% positivi	**Se**	**FNR**
94 (72-99)	1 (0,83-1)	0 (0-0,22)
7 settimane di vita		
% positivi	**Se**	**FNR**
100 (79-1)	1 (0,79-1)	0 (0-0,21)
9 settimane di vita		
% positivi	**Se**	**FNR**
43 (23-66)	0,86 (0,52-0,99)	0,14 (0-0,58)

DISCUSSIONE

Attualmente, il controllo dell'infezione da PRRSV in allevamento si basa su protocolli diagnostici che richiedono prelievi di sangue individuali o a pool ed un significativo impegno economico. L'eventuale utilizzo del fluido orale quale materiale di indagine rappresentativo di un intero box di suini offre un alternativa vantaggiosa al fine di monitorare la circolazione virale all'interno di una popolazione.
I dati relativi alle 4 aziende oggetto dello studio confermano che il fluido orale può essere considerato nel suo complesso una valida alternativa al siero. Pur avendo rilevato un buona corrispondenza in alcuni casi è stata riscontrata una difformità tra i risultati delle due matrici in esame. I gruppi B, C, e D dell'azienda 1 alla 9° settimana ed il gruppo C dell'azienda 4 alla 5° settimana sono risultati positivi al solo fluido orale: tale riscontro potrebbe trovare giustificazione anche nella maggiore rappresentatività del campione saliva che, a differenza del siero, coincide con l'intero box di suini. Per contro sono stati riscontrati positivi al siero e non al fluido orale campioni appartenenti a tre gruppi delle aziende 2 e 3 (azienda 2/gruppo B/9° settimana), azienda 3/gruppo A e B/3° settimana). I risultati ottenuti indicano che la sensibilità del test può essere considerata relativamente soddisfacente dimostrando una variabilità compresa tra il 75 e il 100 %.
Per quanto riguarda la specificità del test si è preferito escluderla in quanto i 10 campioni individuali di siero non possono essere considerati rappresentativi in senso assoluto dell'intero box.
I risultati di questo studio di campo devono essere considerati preliminari e necessitano di ulteriori approfondimenti in merito a molteplici aspetti. Fra questi il protocollo di campionamento che necessita di essere affinato nelle modalità di esecuzione tenendo conto del comportamento dei suini in box e della loro effettivo contributo al campione di fluido orale

finale. Le fasi successive quali trasporto e lavorazione del campione andranno considerate con maggior precisione. Ulteriori dati derivanti e da infezione sperimentali da PRRSV in ambiente controllato e da infezioni naturali in campo si rendono necessari al fine di procedere alla validazione dei protocolli di estrazione e di esecuzione della tecnica RT-PCR.

BIBLIOGRAFIA:

1. Anon. (1996): FDA approves first oral HIV antibody test. *AIDS Alert*., 11: 94
2. Brandtzaeg P. (2007): Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1098: 288-311
3. Cay A., Wellenberg G.J., Kerkhofs P. (2008): Phylogenetic analysis of Dutch and Belgian EU-type PRRSV strains. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, p. 131.
4. Cruijsen T., Hubert P., Guerts V., Swam H. (2008): Detection of a differentiation between Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus strains in the Netherlands. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 June 2008, p. 79.
5. Hoffmann P., Prickett J., Main R., Stensland W., Yoon K-J, Sornsen S., Zimmerman J. (2008): Infectious disease surveillance in wean-finish facilities using oral fluids samples. Proceedings, Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians (unnumbered).
6. Humphrey S.P., Williamson R.T. (2001): A review of saliva: normal composition, flow and function. *J. Prosthet. Dent*., 85: 162-169.
7. Parry J.V. Perry K.R., Mortimer P.P. (1987): Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet*., 2: 72-75
8. 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.
9. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K-J., Evans R.B., Zimmerman J. (2008a): Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diag. Invest*., 20:156-163.
10. Prickett J., Kim W., Simer R., Yoon K-J., Zimmerman J. (2008b): Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J. Swine Health Prod*., 16: 86-91.
11. Lima D.P., Diniz D.G., Moimaz S.A., Sumida D.H., Okamoto A.C. (2009): Saliva: reflection of the body. Int. J. Infect. Dis., ahead of print.
12. McKie A., Vyse A., Marple. (2002): Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. *Lancet. Infect. Dis*. 2:18-24.

DINAMICA TEMPORALE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA VERSO IL VIRUS DELLA PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) IN SCROFETTE

KINETIC DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE TO PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) IN GILTS

DOTTI S.[1], SANDRI G.P.[2], VILLA R.[1], RAZZUOLI E.[1], SOSSI E.[1], AMADORI M.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Brescia;*
[2] *Soc. Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi*

Parole chiave: IgA, PRRS, IFN-γ
Key words: IgA, PRRS, IFN-γ

RIASSUNTO. Scopo del lavoro è stato valutare la cinetica di sviluppo della risposta immunitaria a virus PRRS in due situazioni aziendali differenti. Gli animali arrivavano da due scrofaie identificate come SG e M; entrambe erano PRRS positive, con rimonta proveniente da un moltiplicatore PRRS-free. La problematica da affrontare in tali strutture è stata l'introduzione di un considerevole numero di animali PRRS negativi in un allevamento positivo, al fine di non generare instabilità all'interno delle aziende. A tale scopo si sono messe in opera due diverse "procedure di acclimatamento" per PRRSV: vaccinazione in allevamento SG, condizionamento in allevamento M tramite contatto diretto con soggetti escretori. La risposta cellulo-mediata è stata valutata con l'analisi della presenza di interferone-γ nel plasma dei suini in risposta a PRRSV; i risultati hanno evidenziato, in entrambi i casi, una scarsa induzione di questa citochina a dispetto della siero-conversione anticorpale. Questo risultato confermerebbe quanto riportato anche da altri autori e cioè che non vi è una corrispondenza tra i due tipi di immunità sia con una stimolazione di tipo vaccinale sia con un contatto diretto di animali viremici. Inoltre, i campioni di saliva, prelevati nell'allevamento M, hanno consentito la messa a punto di una metodica ELISA atta ad individuare IgA PRRSV-specifiche, la cui valutazione potrebbe essere affiancata alle altre metodiche normalmente impiegate per la diagnosi della malattia.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the time-course of the immune response to PRRS virus in two PRRSV-positive farms, hereunder named SG and M. Gilts originating from a PRRS-negative multiplier had to be introduced into two PRRS positive commercial herd and the purpose was to house them without creating PRRS outbreaks in the receiving farms under study. For this purpose, two different strategies were adopted: vaccination in farm SG and direct contact with viremic animals in farm M. The cell-mediated immune response was evaluated by a PRRSV-specific interferon-γ release assay; the results showed, in both farms, that the cell-mediated response occurred at a low level and frequency, as opposed to the Ab response. This finding confirms the results by other authors, i.e. the discrepancy between the two kinds of immune response to PRRSV (humoral and cell-mediated), following both vaccination and direct contact with viremic animals. Moreover, with saliva samples collected in farm M, an ELISA assay was performed to detect PRRSV-specific IgA antibodies, the assessment of which could be useful in association with other routine diagnostic methods.

INTRODUZIONE

Il virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRSV) è un *Arterivirus* ad RNA, il quale negli ultimi vent'anni è diventato uno dei maggiori patogeni negli allevamenti suinicoli di tutto il mondo. A tutt'oggi sono stati riconosciuti due genotipi: tipo I (ceppo Europeo) e tipo II (ceppo Americano); inoltre, all'interno di questi due gruppi, esistono numerose varianti che differiscono anche solo per poche basi fra di loro. Tali variazioni geniche possono consentire al virus di sfuggire al sistema immunitario, impedendo a quest'ultimo di innescare una risposta efficace atta ad arrestare lo sviluppo della sintomatologia. I numerosi studi riguardanti la risposta immunitaria di tipo anticorpale (IgM e IgG), hanno dimostrato che il virus determina la comparsa delle immunoglobuline sieriche tra i 7 ed i 14 giorni post infezione, anche se le stesse non presentano un'attività protettiva nei confronti del virus (1). Invece, il ruolo dell'immunità cellulo-mediata non è ancora stato chiarito, anche se si è evidenziato come PRRSV sia in grado di interferire con la secrezione di interferone-γ (IFN-γ) e di interleuchina 10 (IL-10), compromettendo la corretta attivazione dei circuiti citochinici (5, 6). Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la risposta immunitaria di soggetti sottoposti a vaccinazione con virus vivo modificato ed inoculato per via intramuscolare e soggetti sottoposti ad un contatto con animali escretori ed infettatisi naturalmente. I suini sono stati monitorati mediante prelievi ematici al fine di determinare: viremia, immunità umorale, cellulo-mediata; inoltre, sono stati eseguiti prelievi di saliva mediante tamponi per una valutazione dell'immunità mucosale (IgA). In questo senso, il nostro lavoro rappresenta uno studio preliminare sulla cinetica delle immunoglobuline di tipo secretorio (IgA), la cui valutazione potrebbe essere utile al fine di avere un quadro più completo sia per quanto riguarda il meccanismo di interazione virus-ospite sia per la diagnosi di campo.

MATERIALI E METODI

Animali. I due allevamenti oggetto della prova denominati rispettivamente come azienda SG, M e PRRS positive, ricevevano la rimonta ogni quattro settimane di scrofette svezzate a 6 kg di peso (ca. 3 settimane di vita) da un moltiplicatore PRRS negativo. Gli animali erano alloggiati in appositi reparti di "quarantena/svezzamento" situati all'interno del perimetro aziendale, dove sostavano per 8-9 settimane. Successivamente, i gruppi di scrofette erano spostati nei reparti di accrescimento nei quali rimanevano fino all'età di circa 180 giorni, per essere poi trasferite definitivamente alla scrofaia. Nell'allevamento SG si è deciso di immunizzare le scrofette (12 soggetti) mediante vaccinazione, il primo intervento veniva effettuato con un vaccino vivo modificato (*Porsilis PRRS® - Intervet*) due settimane dopo l'arrivo in svezzamento (5 settimane di vita); il secondo intervento di richiamo era somministrato nella fase di accrescimento a circa 5 mesi di vita, utilizzando un vaccino inattivato (*Progressis PRRS® Merial*). Nell'allevamento M si è invece deciso di adottare una procedura di acclimatamento per contatto con soggetti eliminatori. Le scrofette (15 animali) arrivate in allevamento nel reparto "quarantena/svezzamento", in seguito erano trasferite nella struttura di accrescimento, isolata e a "flusso semi-continuo", dove venivano messe a contatto con soggetti eliminatori provenienti dall'azienda stessa.

In entrambi gli allevamenti le scrofette sottoposte alle due diverse procedure di acclimatamento erano successivamente trasferite nei rispettivi reparti di stimolazione/fecondazione.

Indagini di laboratorio. Ciascun animale è stato sottoposto a due prelievi di sangue, rispettivamente utilizzando provette con e senza litio-eparina, al fine di utilizzare sia la porzione sierica sia quella plasmatica del sangue in esame. Nell'allevamento SG sono stati eseguiti due campionamenti di sangue (primo prelievo T0: 60 giorni dopo il vaccino vivo modificato; secondo prelievo T1: 60 giorni dopo il vaccino inattivato), mentre nell'allevamento M sono stati effettuati tre prelievi (primo prelievo T0: 3 mesi di vita; secondo prelievo T1: circa 5

mesi di vita, fase di acclimatamento; terzo prelievo T2: 9 mesi di vita), inoltre in quest'ultima azienda è stata prelevata anche un'aliquota di saliva per ciascun animale al T1 e al T2. Il siero è stato sottoposto a RT-Real Time PCR per la ricerca dell'acido nucleico ascrivibile al virus della PRRS (7); la valutazione della presenza di anticorpi specifici per PRRSV (IgG) è stata eseguita mediante metodica di tipo immunoenzimatico (ELISA), seguendo le indicazioni del produttore (*Herdcheck® IDEXX Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kits*). I sieri sono stati utilizzati anche per la prova di inibizione dell'emoagglutinazione (IH) per il virus dell'influenza, tipo A/SW/H1N1, A/SW/H1N2 e A/SW/H3N2 secondo quanto descritto in Van Reeth *et al*. 2006. Il sangue eparinato è stato sottoposto a controllo per la valutazione della risposta in IFN-γ a PRRSV; tale test ha previsto l'impiego di ceppo Lelystad e di un ceppo appartenente al cluster Italiano, di PBS come controllo negativo e di criolisato MARC-145 al fine di evidenziare un possibile segnale di natura aspecifica. Brevemente, tale metodica prevede il contatto di ciascun campione di sangue con i diversi reagenti sopra riportati per 20 ore ad una temperatura di 37°C e 5% di CO_2 Quindi, si procede alla determinazione di IFN-γ secreto nel plasma in un saggio ELISA che prevede l'impiego di IFN-γ *capture* mAb P2F6 (*Thermo Scientific, Rockford, IL*), e successivamente di anticorpo biotinilato, *anti-swine* IFN-γ mAb MP701B (*Thermo Scientific, Rockford, IL*); infine, l'IFN-γ suino è rivelato mediante l'impiego di streptavidina HRP-coniugata e ortho-phenilenediamina. La lettura della piastra si esegue con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. I campioni sono considerati positivi se l'OD corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS è maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 20 mOD di differenza (riferimento ottenuto mediante analisi eseguite su suini Specific Pathogen Free).
La saliva di ciascun animale è stata ottenuta mediante l'impiego di tamponi (*Salivetten®*), i quali portati in laboratorio, sono stati sottoposti a centrifugazione (1000 g a 5°C per 10 minuti). La reazione immunoenzimatica si basa sull'utilizzo di virus della PRRS (ceppo di Lelystad) che viene purificicato mediante l'utilizzo di gradienti di saccarosio, in questo modo si ottiene solo la frazione di interesse senza residui di cellule MARC-145, le quali vengono comunemente impiegate per l'amplificazione del virus. La metodica prevede di analizzare i campioni di saliva sia messi a contatto con l'antigene virale sia da soli, per mettere in luce eventuali segnali di tipo aspecifico. La presenza di IgA PRRSV-specifiche è evidenziata mediante l'aggiunta di coniugato anti-IgA suine HRP e di ortho-phenilenediamina, la lettura si effettua con spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. Il risultato è espresso come differenza della media ottenuta dai campioni messi a contatto con l'antigene e la media di quelli analizzati senza il medesimo. Il valore di riferimento è pari a 20 mOD di differenza (riferimento ottenuto mediante analisi eseguite su suini Specific Pathogen Free).

RISULTATI. Gli animali non hanno mostrato alcuna sintomatologia clinica evidente e sono tutti entrati nel ciclo riproduttivo di entrambi gli allevamenti. Al primo prelievo, solo un soggetto dell'allevamento SG ha evidenziato positività in RT-Real Time PCR, lo stesso non ha mostrato anticorpi (IgG) specifici nei confronti di PRRSV; tutti gli altri campioni sono risultati virologicamente negativi, ma con IgG sieriche. Al secondo prelievo vi è stata siero-conversione di tutti i soggetti (Tabella n. 1). L'allevamento M non ha mostrato anticorpi al T0 e nemmeno la presenza di RNA virale, mentre al secondo campionamento tutti gli animali tranne uno hanno mostrato anticorpi specifici, i quali hanno evidenziato un andamento calante al T2 (Tabella n. 2).
La risposta in IFN-γ ha indicato 4 animali positivi al secondo prelievo dell'allevamento SG, mentre nell'allevamento M la positività si è evidenziata in 3 soggetti solo al terzo prelievo. Inoltre, alcuni animali hanno mostrato una risposta aspecifica, che potrebbe essere ascrivibile

ad una concomitante infezione virale in atto al momento del prelievo di sangue. Infatti, il siero di tutti gli animali è stato controllato mediante metodica di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) verso il virus dell'influenza e i soggetti con risposta aspecifica in IFN-γ hanno evidenziato una siero-conversione anticorpale nei confronti di H1N1 e H1N2 per l'allevamento SG e H1N2 per l'allevamento M. La risposta in IgA ha evidenziato valori positivi (>20 mOD) in 10 animali su 13 analizzati dell'allevamento M al T1 e solo 3 su 13 al T2, con un andamento inversamente proporzionale, rispetto a quello degli anticorpi sierici al secondo campionamento.

DISCUSSIONE. I dati emersi da questa prova hanno evidenziato nel gruppo sottoposto a vaccinazione (allevamento SG), una risposta bassa in IFN-γ, mentre alcuni soggetti hanno mostrato valori elevati e considerati aspecifici, il che mette in evidenza la possibile presenza di altri agenti virali (influenza) in grado di interferire con la risposta nei confronti del virus della PRRS. In particolare, la positività anticorpale al sottotipo H1N2 non è spiegata dal profilo vaccinale adottato nelle due aziende e quindi ascrivibile a virus di campo. Per quanto riguarda i campioni con esito negativo, tale risultato sembrerebbe suggerire una bassa stimolazione della immunità cellulo-mediata da parte del vaccino (2). Al contrario, la risposta anticorpale è evidente in tutti i soggetti sottoposti a vaccinazione, con la presenza di sieroconversione al secondo prelievo, anche se questo non è sinonimo di protezione come già evidenziato anche da altri Autori (3, 5).
Per quanto riguarda gli animali sottoposti a contatto diretto con soggetti escretori, anche in questo caso la presenza di IFN-γ è abbastanza atipica, in quanto risultano valori bassi con presenza di alcuni campioni che hanno mostrato livelli aspecifici elevati. Le IgG si sviluppano a partire dal terzo campionamento e con andamento variabile, il che dimostra che gli animali si sono infettati con tempistiche differenti.
La valutazione della presenza di IgA specifiche verso il virus della PRRS nella saliva dei suini sottoposti a condizionamento con animali escretori (allevamento M), ha evidenziato soggetti positivi al primo prelievo (10 animali) e i valori sono diminuiti al secondo campionamento, con la positività di soli 3 animali.
In entrambi i casi, la risposta cellulo-mediata (IFN-γ) è risultata meno coinvolta rispetto a quella umorale (IgG); inoltre, le IgA salivari PRRSV specifiche valutate nell'allevamento M, sembrano avere una cinetica differente rispetto alle IgG sieriche, con una drastica riduzione delle prime al T2. Ad una prima analisi, i cui risultati andranno ulteriormente confermati con altri campionamenti, questo andamento potrebbe derivare da un meccanismo di alterazione nella risposta mucosale da parte del virus della PRRS.

CONCLUSIONI. Al momento attuale, non è possibile dire se delle due strategie di acclimatamento impiegate come profilassi (vaccinazione in allevamento infetto, acclimatamento) sia in grado a medio lungo termine di preservare in modo efficace gli animali da possibili re-infezioni con PRRSV; per questo motivo è importante tenere monitorati gli allevamenti ed ottenere il maggior numero di informazioni possibili dai campionamenti eseguiti, al fine di avere un quadro completo ed aggiornato della situazione nel momento in cui si verifica la presenza del virus in allevamento. Questo studio rappresenta una prova preliminare e di messa a punto di due metodiche ELISA (IFN-γ ed IgA) che potrebbero essere affiancate alle tecniche impiegate nella routine diagnostica per PRRS. Questo sarebbe utile per indagare anche l'immunità cellulo-mediata, che, secondo diversi lavori scientifici, sembra essere quella di maggiore interesse nella risposta a questo virus. Il prossimo passo sarà quello di approfondire la valutazione delle IgA mucosali, al fine di capire se queste possano avere un ruolo effettivamente importante nella diagnosi della malattia sia sul singolo animale sia sul gruppo.

BIBLIOGRAFIA. 1) Charerntantanakul W., Platt R., Roth J.A. (2006) "Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production". Viral Immun.; 19, 646-661. **2) 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. Imm. and Immunop. 109, 99-115. **3) Christopher-Hennings J., Faaberg K.S., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Roof M.B.,Vaughn E.M., Yoon K.J., Zimmerman J.** (2002) "Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and Limitations". J. Swine Health Prod, 10 (5), 213-218. **4) Van Reeth K, Labarque G, Pensaert M.** (2006) "Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses.". Viral Immunol. 19 (3), 373-82. **5) Mateu E., Diaz I.** (2008) "The challenge of PRRS immunology". Vet J. 177 (3), 345-51. **6) Molina R.M., Cha S.H., Chittick W., Lawson S., Murtaugh M.P., Nelson E.A., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R., Rowland R.R., Wu W.H., Zimmerman J.J.** (2008) "Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection". Vet Immunol Immunopathol. 126 (3-4), 283-92. **7) Revilla F. S. Wallner B, Truschner K, Benczak A, Brem G, Schmoll F, Mueller M, Steinborn R.** (2005) "The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen". J.Virol Methods 126, 21-30.

Tabella n. 1 Risultati delle indagini virologiche, sierologiche ed immunologiche allevamento SG, utilizzo del vaccino vivo modificato

***Table 1**: Virological, serological and immunological results, farm SG, modified live vaccine*

Allevamento SG (vaccino vivo modificato)						
Prova eseguita	**RT-Real Time PCR**		**ELISA IgG (s/p > 0.4)**		**ELISA IFN-γ (> 20 mOD)**	
Campionamento	**T0**	**T1**	**T0**	**T1**	**T0**	**T1**
Suino 1	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 2	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 3	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 4	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 5	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub
Suino 6	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp
Suino 7	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
Suino 8	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Asp
Suino 9	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 10	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
Suino 11	Neg	NE	Pos	NE	Neg	NE
Suino 12	Neg	NE	Pos	NE	Neg	NE

Legenda: **NE**: non eseguito; **Neg**: valore negativo; **Pos**: campione positivo; **Dub**: campione dubbio; **Asp**: risposta aspecifica; **Prelievi**: **T0**: 60 giorni dopo vaccinazione con virus vivo modificato; secondo prelievo **T1**: 60 giorni dopo vaccinazione con vaccino spento

Notes: **NE**: not done; **Neg**: negative value; **Pos**: positive value; **Dub**: dubious value; **Asp**: aspecific response; **Samples**: **T0**: 60 days after vaccination with modified live vaccine, **T1**: 60 days after vaccination with killed vaccine.

Tabella n. 2 Risultati delle indagini virologiche, sierologiche ed immunologiche allevamento M, acclimatamento con soggetti viremici escretori

Table 2: *Virological, serological and immunological results, farm M, direct contact with viremic animals*

Allevamento M (condizionamento)											
Prova eseguita	**RT-Real Time PCR**			**ELISA IgG (s/p > 0.4)**			**ELISA IFN-γ (> 20 mOD)**			**ELISA IgA (> 20 mOD)**	
Campionamento	**T0**	**T1**	**T2**	**T0**	**T1**	**T2**	**T0**	**T1**	**T2**	**T1**	**T2**
Suino 1	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
Suino 2	Neg	Neg	Neg	Neg	NE	NE	Neg	NE	NE	NE	NE
Suino 3	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp	Neg	Pos	Neg
Suino 4	Neg	Neg	Neg	Neg	NE	NE	Neg	NE	NE	NE	NE
Suino 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Asp	Pos	Pos
Suino 6	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Suino 7	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Dub	Pos	Neg
Suino 8	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
Suino 9	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub	Pos	Pos	Neg
Suino 10	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Dub	Asp	Neg
Suino 11	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Dub	Pos	Pos	Neg
Suino 12	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Asp	Asp	Pos	Neg
Suino 13	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Dub	Asp	Pos	Pos
Suino 14	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Neg	Pos	Pos
Suino 15	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Dub	Neg	Neg	Neg

Legenda: **NE**: non eseguito; **Neg**: valore negativo; **Pos**: valore positivo; **Dub**: valore dubbio; **Asp**: risposta aspecifica; **Prelievi**: **T0**: 3 mesi di vita; **T1**: circa 5 mesi di vita, fase di acclimatamento; **T2**: 9 mesi di vita

Notes: **NE**: not done; **Neg**: negative value; **Pos**: positive value; **Dub**: dubious value; **Asp**: aspecific response; **Samples**: **T0**: 3 months old; **T1**: 5 months old; **T2**: 9 months old.

IL TUO PARTNER IN TERAPIA VETERINARIA E NUTRIZIONE

chemifarma® S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - Italy
Tel. +39 **0543 796464** - Fax +39 **0543 796479**
e-mail: info@chemifarma.it - **www.chemifarma.it**

STUDIO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI *SWINE TORQUE TENO VIRUS* GENOGRUPPI 1 E 2 E COINFEZIONE CON *PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2* IN SIERI DI SUINI ALLEVATI IN ITALIA (DAL 1990 AL 2009)

RETROSPECTIVE STUDY ON SWINE *TORQUE TENO VIRUS* GENOGROUPS 1 AND 2 AND *PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2* COINFECTION IN ITALIAN PIG SERA (FROM 1990 TO 2009)

BRESAOLA M.[1], LOMBARDO T. [2], VILLA R. [2], SOSSI E. [2], FERRARI M. [2]

[1]*Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma;* [2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

Parole chiave: Swine Torque teno virus, Porcine circovirus type 2, studio retrospettivo, coinfezione.

Key words: Swine Torque teno virus, Porcine circovirus type 2, retrospective study, coinfection.

Riassunto. Il *Torque teno virus* (TTV) fu isolato per la prima volta nel 1997 in un paziente umano affetto da epatite. Successivamente seguirono isolamenti in diverse specie animali quali: suini, bovini, pecore, cani e gatti. Recenti studi suggeriscono che il swine TTV (swTTV) possa giocare un ruolo importante in alcune patologie del suino, in particolar modo per quanto concerne la post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In questo studio retrospettivo è stata determinata la prevalenza di swTTV, genogruppi 1 (swTTV1) e 2 (swTTV2), e *Porcine circovirus type 2* (PCV2) in sieri di suini italiani conservati dal 1990 al 2009. Il principale obbiettivo è stato quello di valutare l'esistenza di un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da swTTV, genogruppi 1 e 2, e PCV2. Prendendo in considerazione l'intero periodo d'osservazione, 73 dei 95 campioni (76,84%) sono risultati positivi per almeno uno dei due genogruppi di swTTV, mentre 27 dei 95 campioni (28,42%) sono risultati positivi per entrambi i genogruppi. L'infezione da swTTV genogruppo 1 (54 di 95, 56,84%) si è dimostrata prevalente rispetto al genogruppo 2 (46 di 95, 48,42%). Inoltre, 41 dei 95 campioni (43,16%) sono risultati positivi per PCV2. Infine, 20 dei 95 campioni (21,05%) erano co-infetti da swTTV1 e PCV2, mentre 27 (28,42%) erano co-infetti da swTTV2 e PCV2. I risultati ottenuti evidenziano un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione swTTV2 e PCV2.

Abstract. Torque teno virus (TTV) was first isolated from a human hepatitis patient in 1997. TTV was also identified in several animals, including pigs, cattle, sheep, cats and dogs. Recent studies suggest that swine TTV (swTTV) could play aetiological roles in pig diseases, in particular in post-weaning multisystemic wasting syndrome. In this retrospective study, we analysed the prevalence of swTTV, genogroups 1 (swTTV1) and 2 (swTTV2), and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in Italian pig sera between years 1990 and 2009. The main objective is to assess whether there was a statistically significant association between swTTV and PCV2 infection. Taking into account the whole study period, 73 out of 95 animals (76,84%) were infected with one or the other genogroup of swTTV, while 27 out of 95 pigs (28,42%) were co-infected with both genogroups. swTTV genogroup 1 (54 out of 95, 56,84%) was more prevalent than genogroup 2 (46 out of 95, 48,42%). Moreover, 41 out of 95 animals (43,16%) were infected with PCV2. Then, 20 out of 95 animals (21,05%)

were co-infected with swTTV1 and PCV2, while 27 out of 95 animals (28,42%) were co-infected with swTTV2 and PCV2. These results suggest that there is a statistically significant association between swTTV2 and PCV2 infection.

INTRODUZIONE

Nel 1997, in un paziente giapponese affetto da epatite post-trasfusionale ad eziologia sconosciuta, fu isolato per la prima volta il "TT" virus (TTV) (Nishizawa et al. 1997).
Dal 1997 ad oggi si sono susseguiti numerosi isolamenti di TTV in pazienti affetti da gravi patologie, in particolare fibrosi polmonari idiopatiche e tumori primari in sede polmonare (Bando et al. 2008).
L'infezione da TTV non è limitata alla sola specie umana. Gli isolamenti virali condotti nell'ultimo decennio hanno evidenziato come molte altre specie risultino sensibili all'infezione da TTV: chimpanzee, macaco giapponese, tupaia (Okamoto et al. 2002). Negli animali domestici il virus è stato isolato nel cane, nel gatto (Okamoto et al. 2002), nel bovino (Brassard et al. 2009), nel suino e nel cinghiale (Martinez et al. 2006).
Nel suino, in particolare, sono stati identificati due genogruppi di swine TTV (swTTV) (Brassard et al. 2008). Campioni di siero positivi al genogruppo 1 sono stati individuati in vari Paesi del mondo (Canada, Cina, Corea, Spagna, Francia, Italia, Tailandia e USA) con un *range* di prevalenza compreso fra il 24% ed il 100% (Bigarre et al. 2005; McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006). Le conoscenze relative al genogruppo 2 sono limitate e ulteriori studi dovranno essere condotti al fine di accertarne la prevalenza.
TTV è un virus privo di "envelope" il cui patrimonio genetico è costituito da un singolo filamento circolare di DNA (Kekarainen, Segales 2009).
Attualmente il TTV appartiene alla famiglia *Circoviridae,* genere *Anellovirus***,** tuttavia questa classificazione è ancora oggetto di dibattito nella comunità scientifica (Biagini 2009).
Nel suino il virus è stato isolato in campioni di siero, tamponi nasali e rettali. La trasmissione è dimostrata sia per via orizzontale (suino - suino) (Sibila et al. 2009b) che per via verticale (transplacentare/intrauterina e durante la lattazione) (Martinez-Guino, Kekarainen & Segales 2009; Pozzuto et al. 2009); l'infezione talvolta può diventare persistente (Sibila et al. 2009a).
Nei suini l'infezione da swTTV non rappresenta di per sé una causa sufficiente a determinare uno stato di malattia nei soggetti colpiti (Segales et al. 2009; Krakowka, Ellis 2008). Tuttavia, come dimostrato da più studi, è possibile attribuire un ruolo di agente co-infettivo del swTTV in corso di altre patologie (Ellis, Allan & Krakowka 2008; Kekarainen, Sibila & Segales 2006).

Nel 1990 venne isolato per la prima volta nel suino un nuovo *Porcine Circovirus* (PCV) (Allan, Ellis 2000)**,** differente dal PCV noto all'epoca come contaminante delle colture cellulari PK-15 (Tischer et al. 1982). Il virus originale fu così chiamato *Porcine Circovirus 1* (PCV1) mentre il nuovo virus *Porcine Circovirus 2* (PCV2) (Allan et al. 1999).
PCV2 è un virus a DNA, il cui patrimonio genetico è costituito da un singolo filamento circolare contenente 1776-1678 nucleotidi (Hamel, Lin & Nayar 1998).
L'infezione da PCV2 nel suino è stata associata negli anni a diverse condizioni patologiche: alla postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), alla porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), al porcine respiratory disease complex e a turbe riproduttive. Attualmente con la terminologia "porcine circovirus diseases"

(PCVD) sono indicate tutte le condizioni patologiche riferibili al PCV2 (Segales, Allan 2006).
Precedenti studi hanno dimostrato l'elevata prevalenza di swTTV nella popolazione suina (McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006; Kekarainen, Lopez-Soria & Segales 2007; Ellis, Allan & Krakowka 2008; Brassard et al. 2008). Poiché il solo agente infettivo si è dimostrato insufficiente a determinare un quadro patologico nell'ospite, al swTTV è stato attribuito un ruolo di co-fattore in patologie conclamate. In particolare è stata messa in evidenza da più Autori come la prevalenza di swTTV aumenti in allevamenti in cui è manifesta la PMWS (Kekarainen, Sibila & Segales 2006; Taira et al. 2009).
Scopo del presente studio è quello di verificare, mediante un'indagine retrospettiva (1990-2009), se anche nella popolazione suina italiana esiste una correlazione statisticamente significativa fra l'infezione con swTTV e PCV2. Oltre all'obiettivo precedentemente indicato verranno valutati altri aspetti quali il decorso della prevalenza di swTTV genotipo 1 e 2 e PCV2 negli anni in esame, la diversa associazione fra swTTV1/PCV2 e swTTV2/PCV2.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio retrospettivo (1990-2009), volto ad accertare la prevalenza di swTTV e la coinfezione con PCV2, sono stati esaminati sieri di suino conservati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZLER). Nel complesso sono stati utilizzati 95 sieri cercando, per quanto possibile, di sottoporre ad esame 10 campioni per biennio. Trattasi di sieri di animali provenienti da allevamenti del nord Italia e conservati ad una temperatura di -20°C. Nessun altra informazione aggiuntiva è disponibile relativamente ai campioni esaminati.

L'estrazione del DNA dai sieri è stata effettuata con l'ausilio del kit commerciale QIAamp DNA Mini Kiy.
La PCR per swTTV è stata eseguita utilizzando due coppie di primer distinte per swTTV1
(5'-CGGGTTCAGGAGGCTCAAT-3'Primer forward) (5'- GCCATTCGGAACTGCACTTA CT-3' Primer reverse)
e swTTV-2 (5'-TCATGACAGGGTTCACCGGA-3'Primer forward)
(5'- CGTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA -3' Primer reverse).
Per la PCR si sono utilizzati i seguenti reagenti Qiagen: Buffer II 10X, MgCl2 25 mM, dNTPs 2.5 mM each, Primer F 10 μM, Primer R 10 μM, Taq polimerasi.
Il Ciclo di PCR, effettuato su un termociclatore Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems), prevede le seguenti fasi: denaturazione iniziale 94°C per 5 minuti, denaturazione 94°C per 15", annealing 54°C per 20", estensione 72°C per 30" (50 cicli) ed estensione finale 72°C per 5 minuti.
La rivelazione delle bande è avvenuta tramite l'utilizzo del transilluminatore Chemi doc (Biorad). La dimensione delle bande che testimoniano l'avvenuta amplificazione varia a seconda del genogruppo investigato: 300 bp per swTTV1 e 252 bp per swTTV2

Ricerca DNA di PCV2

La presenza di genoma virale riferibile a PCV2 è stata evidenziata mediante una reazione PCR- RT TaqMan, che prevede l'utilizzo di una sonda FAM (6-carboxy-fluorescein) in

grado di legarsi in maniera specifica ad una sequenza oligonucleotidica compresa fra i due primer forward e reverse (5'-TAGGTGAGGGCTGTGGCCTTT-3' Primer forward)
(5'-ATGGCATCTTCAACACCCGCC-3' Primer reverse)
(5'-FAM-ATCTCATCATGTCCACCGCCCAGGA-BHQ1-3' Sonda)
Per la PCR si sono utilizzati i seguenti reagenti Qiagen: Quanti Tect Virus Master Mix, Primer F 5 μM Primer R 5 μM Sonda 2.5 μM
Il Ciclo di PCR-RT prevede le seguenti fasi: denaturazione 95°C per 5 minuti, denaturazione 95°C per 15", annealing/estensione/lettura emissione 60°C per 45" (50 cicli)
L'esecuzione della PCR-RT permette di consultare l'esito direttamente sul computer. Per l'interpretazione dei risultati viene valutato il valore del Ct associato ad ogni campione. Sono identificati come positivi al PCV2 campioni che presentano un CT≤39 e negativi i campioni con un Ct>39.7

Analisi statistica
Per l'analisi statistica delle prevalenze di coinfezione fra swTTV e PCV2 è stato utilizzato il Fisher's exact test, con significatività fissata a $p<0.05$. GraphPrism5® è il software utilizzato per l'elaborazione statistica dei dati.

RISULTATI
Prevalenza di swTTV
Dei 95 campioni esaminati 54 sono risultati positivi per swTTV1 (56,84% swTTV1+) e 46 positivi per swTTV2 (48,42% swTTV2+). I sieri positivi a swTTV1 **o** swTTV2 erano 73 (76,84% swTTV+), mentre i negativi ad entrambi i genotipi 22 (23,16% swTTV-). Infine, sono risultati positivi per **entrambi** i genotipi di swTTV 27 campioni (28,42% swTTV1/2+) (tabella numero 1).

Tab.1. Prevalenza swTTV genogruppi 1 e 2
Tab.1. swTTV genogroups 1 and 2 prevalence

Anno	n° camp	swTTV+	swTTV1/2+	swTTV1+	swTTV2+	swTTV-
1990	10	4	1	3	2	6
1992	10	8	1	1	8	2
1996	5	1	0	0	1	4
1998	10	10	7	10	7	0
2000	10	10	5	8	7	0
2002	10	6	0	6	0	4
2006	10	6	0	5	1	4
2007	10	8	3	5	6	2
2008	10	10	7	8	9	0
2009	10	10	3	8	5	0
tot	95	73	27	54	46	22
%	100,00	76,84	28,42	56,84	48,42	23,16

Prevalenza di PCV2
Sono risultati positivi e negativi per PCV2 rispettivamente 41 (43,16% PCV2+) e 54 (56,84% PCV2-) campioni (tabella numero 2).

Tab.2. prevalenza PCV2
Tab.2. PCV2 prevalence

Anno	n° camp	PCV2+	PCV2-
1990	10	0	10
1992	10	8	2
1996	5	1	4
1998	10	1	9
2000	10	5	5
2002	10	1	9
2006	10	1	9
2007	10	7	3
2008	10	9	1
2009	10	8	2
tot	95	41	54
%	**100,00**	**43,16**	**56,84**

Coinfezione di swine Torque Teno virus genogruppi 1 e 2 / Porcine Circovirus type 2
Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfetti da swTTV e PCV2 38 sieri (40,00% swTTV+/PCV2+). I rimanenti 57 sieri (60%) erano cosi suddivisi: 35 swTTV positivi e PCV2 negativi (36,84% swTTV+/PCV2-), 3 swTTV negativi e PCV2 positivi (3,16% swTTV-/ PCV2+) e 19 swTTV negativi e PCV2 negativi (20% swTTV-/PCV2-) (tabella numero 3) .

Coinfezione di swine Torque Teno virus genogruppo 1 / Porcine Circovirus type 2
Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfetti da swTTV1 e PCV2 20 sieri (21,05% swTTV1+/PCV2+). I rimanenti 75 sieri (78,95%) erano cosi suddivisi: 34 swTTV1 positivi e PCV2 negativi (35,79% swTTV1+/PCV2-), 21 swTTV1 negativi e PCV2 positivi (22.11% swTTV1-/PCV2+) e 20 swTTV1 negativi e PCV2 negativi (21.05% swTTV1-/ PCV2-) (tabella numero 3) .

Coinfezione di *swine Torque Teno virus* genogruppo 2 / *Porcine Circovirus type 2*
Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfetti da swTTV2 e PCV2 27 sieri (28,42% swTTV2+/PCV2+).I rimanenti 68 sieri (71,58%) erano cosi suddivisi: 19 swTTV2 positivi e PCV2 negativi (20,00% swTTV2+/PCV2-), 14 swTTV2 negativi e PCV2 positivi (14,74% swTTV1-/PCV2+) e 35 swTTV2 negativi e PCV2 negativi (36,84% swTTV2-/ PCV2-) (tabella numero 3).

Tab.3. coinfezione swTTV/PCV2

Tab.3. swTTV/PCV2 coinfection

Anno	n° camp	swTTV+/PCV2+	swTTV1+/PCV2+	swTTV2+/PCV2+
1990	10	0	0	0
1992	10	7	1	7
1996	5	1	0	0
1998	10	1	1	0
2000	10	5	4	3
2002	10	0	0	0
2006	10	1	0	1
2007	10	6	3	4
2008	10	9	6	8
2009	10	8	5	4
Tot	95	38	20	27
%	100,00	40,00	21,05	28,42

DISCUSSIONE

I dati emersi in questo studio retrospettivo indicano che l'infezione da swTTV nei suini allevati in Italia fosse già presente dal 1990, ovvero nove anni prima dell'isolamento del TTV nei suini (Leary et al. 1999). Dei 95 campioni esaminati il 77% è risultato positivo a swTTV.

I precedenti lavori condotti in altri Paesi hanno dimostrato come la prevalenza di swTTV sia alquanto variabile: dal 24% al 100% (McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006; Bigarre et al. 2005; Kekarainen, Sibila & Segales 2006).

Anche per quanto riguarda l'infezione da PCV2, appare chiaro come questa sia particolarmente diffusa, indipendentemente dal manifestarsi o meno della PMWS. Nello studio condotto ritroviamo sieri positivi a PCV2 (43%) a partire dal 1992, ma dalla letteratura presente in merito è logico ritenere che la sua circolazione, anche in Italia, sia antecedente a questa data. E' infatti dimostrata la presenza di PCV2 a partire dal 1962 in Europa (Jacobsen et al. 2009), dal 1973 in America (Ramirez-Mendoza et al. 2007) e dal 1989 in Asia (Mori et al. 2000).

Considerando la prevalenza dei due genogruppi di swTTV è emerso che il genogruppo 1 (57%) è più diffuso del genogruppo 2 (42%) e che il 28% dei campioni è positivo ad entrambi i genogruppi.

Esaminando i casi di coinfezione swTTV/PCV2 il 40% dei campioni risulta essere positivo per entrambi gli agenti virali; il dato più interessante è che il 93% dei campioni PCV2 positivi è contemporaneamente positivo per swTTV. Alla luce dei dati ottenuti, è dunque possibile sostenere che esiste un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e da swTTV ($p<0.05$).

Nel caso di swTTV1 risultano coinfetti con PCV2 il 21% dei 95 campioni, mentre solamente il 49% di quelli PCV2 positivi. Non è dunque possibile stabilire un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV1 ($p<0.05$).

Per swTTV2 risultano coinfetti con PCV2 il 28% dei 95 campioni, cioè il 66% dei campioni

PCV2 positivi. E' dunque possibile stabilire un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV2 ($p<0.05$) (tabella numero 4).

Tab.4. Positività per swTTV in campioni PCV2+

Tab.4. Positivity for swTTV in PCV2+ sample

%	swTTV+	swTT1+	swTTV2+
campioni PCV2+	93,00	49,00	66,00

CONCLUSIONI

Dallo studio retrospettivo condotto appare evidente come il swTTV, genogruppi 1 e 2, sia presente nella popolazione suina Italiana dal 1990.
L'elevata omologia fra le regioni sequenziate nel presente lavoro e quelle disponibili in banca dati, indica la scarsa variabilità del virus, sia nel tempo che nello "spazio". Questo fatto si ritiene legato alla scarsa pressione immunitaria a cui è sottoposto il virus e conferma quanto precedentemente riscontrato da altri autori.
I dati rilevati evidenziano che **esiste un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV genogruppo 2**.
Alla luce del possibile ruolo patogenetico del swTTV (peraltro molto simile a quello del PCV2) e della sua notevole diffusione nella popolazione suina, si ritiene che l'aspetto coinfettivo dei due agenti virali meriti ulteriori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

- ALLAN G., MC NEILLY F., MEEHAN B., KENNEDY S., MACKIE D., ELLIS J., CLARK E., ESPUNA E., SAUBI N. & RIERA P. (1999) Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in spain, denmark and northern ireland. Veterinary Microbiology 66, 115-123
- BANDO M., TAKAHASHI M., OHNO S., HOSONO T., HIRONAKA M., OKAMOTO H. & SUGIYAMA Y. (2008) Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. Respirology (Carlton, Vic.) 13, 263-269
- BIAGINI P. (2009) Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). Current Topics in Microbiology and Immunology 331, 21-33
- BIAGINI P., GALLIAN P., ATTOUI H., TOUINSSI M., CANTALOUBE J., DE MICCO P. & DE LAMBALLERIE X. (2001) Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. The Journal of General Virology 82, 379-383
- BIGARRE L., BEVEN V., DE BOISSESON C., GRASLAND B., ROSE N., BIAGINI P. & JESTIN A. (2005) Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in france. Journal of General Virology 86, 631
- BRASSARD J., GAGNE M. J., HOUDE A., POITRAS E. & WARD P. (2009) Development of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of porcine and bovine torque teno virus. Journal of Applied Microbiology

- BRASSARD J., GAGNE M. J., LAMOUREUX L., INGLIS G. D., LEBLANC D. & HOUDE A. (2008) Molecular detection of bovine and porcine torque teno virus in plasma and feces. Veterinary Microbiology 126, 271-276
- ELLIS J. A., ALLAN G. & KRAKOWKA S. (2008) Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. American Journal of Veterinary Research 69, 1608-1614
- HAMEL A. L., LIN L. L. & NAYAR G. P. S. (1998) Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. Journal of Virology 72, 5262
- JACOBSEN B., KRUEGER L., SEELIGER F., BRUEGMANN M., SEGALES J. & BAUMGAERTNER W. (2009) Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in northern germany. Veterinary Microbiology 138, 27-33
- KEKARAINEN T., LOPEZ-SORIA S. & SEGALES J. (2007) Detection of swine torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. Theriogenology 68, 966-971
- KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. Veterinary Journal (London, England : 1997) 180, 163-168
- KEKARAINEN T., SIBILA M. & SEGALES J. (2006) Prevalence of swine torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in spain. The Journal of General Virology 87, 833-837
- KRAKOWKA S. & ELLIS J. A. (2008) Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. American Journal of Veterinary Research 69, 1623-1629
- LEARY T. P., ERKER J. C., CHALMERS M. L., DESAI S. M. & MUSHAHWAR I. K. (1999) Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. Journal of General Virology 80, 2115
- MARTELLI F., CAPRIOLI A., DI BARTOLO I., CIBIN V., PEZZOTTI G., RUGGERI F. M. & OSTANELLO F. (2006) Detection of swine torque teno virus in italian pig herds. Journal of Veterinary Medicine.B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health 53, 234-238
- MARTINEZ L., KEKARAINEN T., SIBILA M., RUIZ-FONS F., VIDAL D., GORTAZAR C. & SEGALES J. (2006) Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the european wild boar (sus scrofa). Veterinary Microbiology 118, 223-229
- MARTINEZ-GUINO L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Evidence of torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. Theriogenology 71, 1390-1395
- MCKEOWN N. E., FENAUX M., HALBUR P. G. & MENG X. J. (2004) Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. Veterinary Microbiology 104, 113-117
- MORI M., SATO K., AKACHI S., ASAHI S., TANIGUCHI S. & NARITA M. (2000) Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in japan: Seven cases in 1989. Veterinary Pathology Online 37, 667
- NISHIZAWA T., OKAMOTO H., KONISHI K., YOSHIZAWA H., MIYAKAWA Y. & MAYUMI M. (1997) A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Biochemical

and Biophysical Research Communications 241, 92-97
- OKAMOTO H., NISHIZAWA T., TAWARA A., PENG Y., TAKAHASHI M., KISHIMOTO J., TANAKA T., MIYAKAWA Y. & MAYUMI M. (2000) Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. Virology 277, 368-378
- OKAMOTO H., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., TAWARA A., FUKAI K., MURAMATSU U., NAITO Y. & YOSHIKAWA A. (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. The Journal of General Virology 83, 1291-1297
- OKAMOTO H., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., TAWARA A., FUKAI K., MURAMATSU U., NAITO Y. & YOSHIKAWA A. (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. The Journal of General Virology 83, 1291-1297
- POZZUTO T., MUELLER B., MEEHAN B., RINGLER S. S., MCINTOSH K. A., ELLIS J. A., MANKERTZ A. & KRAKOWKA S. (2009) In utero transmission of porcine torque teno viruses. Veterinary Microbiology 137, 375-379
- RAMIREZ-MENDOZA H., MARTINEZ C., MERCADO C., CASTILLO-JUAREZ H., HERNANDEZ J. & SEGALES J. (2007) Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from mexico city. Research in Veterinary Science 83, 130-132
- SEGALES J. & ALLAN G. (2006) Disease of swine, 9th
- SEGALES J., MARTINEZ-GUINO L., CORTEY M., NAVARRO N., HUERTA E., SIBILA M., PUJOLS J. & KEKARAINEN T. (2009) Retrospective study on swine torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in spain. Veterinary Microbiology 134, 199-207
- SIBILA M., MARTINEZ-GUINO L., HUERTA E., LLORENS A., MORA M., GRAU-ROMA L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. Veterinary Microbiology 139, 213-218
- SIBILA M., MARTINEZ-GUINO L., HUERTA E., MORA M., GRAU-ROMA L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. Veterinary Microbiology 137, 354-358
- TAKAHASHI K., IWASA Y., HIJIKATA M. & MISHIRO S. (2000) Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. Archives of Virology 145, 979-993
- TISCHER I., GELDERBLOM H., VETTERMANN W. & KOCH M. (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature 295, 64-66

LIVELLI DI LIPOPOLISACCARIDI SIERICI SUPERIORI IN SUINI COLPITI DA FORME DI DIMAGRIMENTO E DEPERIMENTO NEL SETTORE SVEZZAMENTO

HIGHER SERUM LYPOPOLYSACCARIDES IN WEANED PIGLETS AFFECTED BY SYNDROMES OF WASTING

CANDOTTI P., NASSUATO C., ROTA NODARI S.

Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia;

Parole chiave: suino, deperimento, endotossina, LPS, PCV2
Key words: pig, wasting, endotoxin, LPS, PCV2

Riassunto
Per la prova sono stati selezionati 5 allevamenti di suini sani e 13 allevamenti che presentavano nel settore svezzamento una sintomatologia clinica attribuibile alla forma di deperimento multi sistemico post-svezzamento. In ogni allevamento sono stati eseguiti prelievi ematici in 10 suini allo svezzamento. I campioni ematici sono stati testati per evidenziare il livello di lipopolisaccaridi (LPS), Il-10 e TNF-α. I risultati hanno evidenziato che negli animali con sintomatologia da deperimento il livello di LPS ematici era più elevato rispetto agli animali clinicamente sani. L'aumento del livello degli LPS ematici potrebbe essere associato alla sintomatologia di deperimento osservata. In particolare, è stato stabilito un cut off di 0,44 EU/ml (sensibilità del 93% e specificità del 82%). Il-10 e TNF-α non sono risultati associati agli LPS.

Abstract
Five healthy farms and 13 farms with a post-weaning multisystemic wasting syndrome were selected for the study. Ten weaners were blood sampled in each farm. Blood samples were tested for lypopolisaccarides (LPS), Il-10 and TNF-α level. Results showed that the animals with a wasting syndrome had a higher serum level of LPS compared with healthy animals. The higher level of LPS could be associated with the wasting syndrome observed. It was individuated a cut-off of 0,44 EU/ml (sensitivity of 93% and specificity of 82%). Il-10 and TNF-α were not associated with LPS levels.

Introduzione
Nel 1996 nel Nord America viene descritta per la prima volta una sindrome caratterizzata dai segni clinici di deperimento nei suini nella fase post-svezzamento (Clark, 1997). Dopo tale segnalazione la sindrome è stata evidenziata in tutto il mondo con segni clinici molto variabili e caratterizzati da deperimento, forme respiratorie, aumento dei linfonodi inguinali superficiali, diarrea e deplezione linfocitaria generalizzata. Era frequente, inoltre, l'osservazione di infezioni secondarie da batteri opportunisti. La sindrome, a cui era stata attribuita la denominazione di PMWS (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*) è stata recentemente rinominata PCVD (*Porcine Circovirus Disease*) (Opriessnig et al., 2007). Si ritiene che l'agente responsabile della malattia sia PCV2 (circovirus suino tipo 2) in associazione a potenziali fattori stimolanti in grado di innescare la sintomatologia clinica. Sperimentalmente la sindrome è stata riprodotta utilizzando diversi fattori scatenanti (tra i quali ad esempio l'inoculazione di Parvovirus suino, Allan et al., 1999)

ma nessuno di questi è risultato efficace e ripetibile nei suini convenzionali, anche se il fattore scatenante per la PMWS sembra essere un'alterazione del sistema immunitario indotta dallo stesso PCV2 o da un fattore scatenante (Fort et al., 2009).
In studi precedenti i lipopolisaccaridi (LPS) sono stati utilizzati per riprodurre le malattie respiratorie multifattoriali del suino, inoculandoli in associazione con il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRS) o il coronavirus respiratorio del suino (PRCV) (Van Gucht et al., 2006). In questi studi è stato dimostrato che gli LPS hanno un effetto immunomodulatore, determinando una sovra espressione di alcune citochine, in particolare TNF-α (Van Reeth et al., 2000) correlato alla manifestazione clinica della malattia, mentre recentemente è stata evidenziata una up-regulation dell'IL-10 da parte del PCV2. Uno studio di Chang et al. (2006) ha dimostrato che gli LPS in vitro sono in grado di determinare una *up-regulation* della replicazione di PCV2 nei macrofagi polmonari di suino. Il loro effetto, tuttavia, non è stato ancora completamente chiarito. L'inoculazione, infatti, intramuscolare di LPS associata a infezione oronasale con PCV2 di suini CDCD (*Colostrum Deprived Cesarean Derived*) non è stata in grado di innescare la malattia (Fort et al., 2009). Le diverse specie animali presentano marcate differenze nella loro sensibilità alle endotossine e alla dose per loro necessaria per indurre il 100% della letalità (LD_{100}). I suini, così come i ruminanti, sono estremamente sensibili alle endotossine, dal momento che dosaggi relativamente bassi di LPS (<5 μg Kg^{-1}) sono in grado di determinare effetti marcati sul sistema cardiovascolare, in particolare sulla circolazione polmonare (Berczi et al., 1966; Olson et al., 1995). Sebbene il meccanismo preciso per il quale ciò avvenga non sia del tutto chiaro, è stato speculato che ciò possa essere dovuto alla presenza di macrofagi intravascolari che sono localizzati nella circolazione polmonare del suino.
La degradazione della parete dei batteri gram negativi determina il rilascio degli LPS nell'ambiente in cui i batteri si trovano al momento della loro disgregazione. Gram negativi presenti nel torrente circolatorio possono quindi dare origine alla circolazione degli LPS, ma questa non è la sola possibile fonte di ingresso delle endotossine. I lipopolisaccaridi, infatti, possono penetrare nel torrente circolatorio anche dalla sede polmonare, da quella enterica e da quella inalatoria (Michel, 2000). Negli allevamenti di suini, è presente molta polvere che proviene dalla cute, dal pelo, dalle feci e dall'alimento degli animali e in queste polveri possono essere presenti oltre a ife e spore fungine, micotossine e batteri, anche endotossine.
L'obiettivo del presente studio era quello di determinare i livelli sierici di LPS, IL-10 e TNF-α in suini allo svezzamento clinicamente sani e in suini allo svezzamento con una forma di deperimento clinicamente ascrivibile alla sindrome del deperimento multistemico post-svezzamento.

Materiali e Metodi

Per lo studio sono stati selezionati 18 allevamenti di suini classificati in allevamenti clinicamente sani ("sani", n=5) e allevamenti con sintomatologia da deperimento allo svezzamento ("con sintomatologia", n=13).
La visita dell'allevamento è sempre avvenuta dopo un colloquio telefonico con il veterinario responsabile dell'allevamento, volto a chiarire lo status sanitario della categoria di animali interesse, ovvero animali "sani" o animali "con sintomatologia".
In allevamento è stata svolta un'indagine anamnestica in presenza dell'allevatore e del veterinario responsabile, in modo da poter valutare lo stato sanitario degli animali nei 6 mesi precedenti alla visita.

In una seconda fase si è proceduto a un'analisi clinica del settore svezzamento volto a verificare che gli animali da un punto di vista clinico rientrassero all'interno di una delle due classi e non fossero affetti da altre patologie.
In particolare, un allevamento è stato classificato "sano" quando l'anamnesi non rivelava alcuna patologia di origine infettiva, alimentare o gestionale nei 6 mesi precedenti alla visita, alla visita clinica veniva evidenziato un buono stato di salute e nei 3 mesi successivi alla visita non comparivano problemi sanitari in allevamento.
Un allevamento veniva definito "con sintomatologia" quando nel settore svezzamento erano presenti segni clinici tipici della sindrome del deperimento multisistemico post-svezzamento (deperimento, aumento dei linfonodi inguinali, diarrea, pallore, ittero, tosse, febbre, ulcera gastrica) ed eventualmente forme di PDNS e dopo che l'esame necroscopico eseguito su animali allo svezzamento avesse confermato il sospetto clinico per la presenza di polmonite interstiziale, aumento dei linfonodi inguinali ed eventuali lesioni associate (ulcera gastrica, enterite, ittero, etc.).

In ogni allevamento nel settore svezzamento sono stati selezionati 10 soggetti privi di lesioni esterne (infettive o traumatiche). Negli allevamenti "sani" sono stati selezionati soggetti sani con ottimo BCS (*Body Condition Score*). Negli allevamenti "con sintomatologia" sono stati selezionati animali con dimagrimento, deperimento, aumento marcato dei linfonodi inguinali ed eventuale pallore, ittero o febbre. In ogni animale è stato effettuato un prelievo ematico. Per il prelievo sono state utilizzate siringhe e aghi apirogeni e il sangue è stato trasferito, in campo, in una provetta di vetro resa apirogena mediante sterilizzazione a 180°C per 4 ore. Prima di procedere al prelievo ematico la cute dell'animale è stata sottoposta a pulizia e disinfezione con alcool 94°C denaturato.
Il campione è stato trasportato in condizioni di refrigerazione fino al laboratorio dove è stato centrifugato per 20 minuti a una velocità di 3000 giri/minuto, poi stoccato a un'aliquota di 1500μL in provetta apirogena sterile BD FalconTM da 5ml in polistirene a -80°C. Prima di procedere all'esecuzione del test Kinetic Cromogenic Assay secondo le indicazioni della ditta produttrice (Associates of Cape Cod Incorporated, 124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536), i campioni sono stati inattivati a 60°C e filtrati con filtri Gelman 0.4 millimicron.

Analisi statistica

L'effetto della condizione di malattia sul parametro di interesse LPS è stato indagato mediante un'analisi della varianza per misure ripetute applicando un modello lineare a effetti misti con la condizione di malattia, l'interleuchina 10 e il TNF-α come covariate. La variabile identificativa dell'allevamento è stata trattata come effetto random per tenere in considerazione l'eventuale correlazione tra le misure. Sono stati considerati indicativi di significatività statistica valori di p-value inferiori a 0.05.
L'individuazione del cut-off di LPS ai fini della predizione della condizione di malattia è stata effettuata mediante regressione logistica e analisi della curva ROC (Receiver Operating characteristic curve).
L'analisi statistica è stata effettuata con il software open-source R (versione 2.8.1).

Risultati

In figura 1 viene riportata la media e l'intervallo di confidenza dei livelli di LPS evidenziati nei due gruppi esaminati.

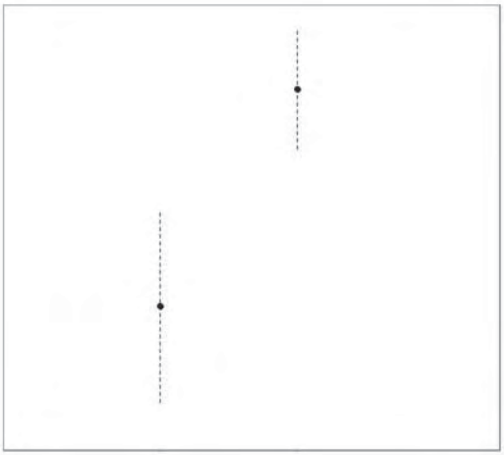


Figura 1. Livelli (media e I.C: 95%) di LPS nei due gruppi esaminati
Figure 1. Levels (mean and C.I.95%) of LPS in the two groups of treatment

La condizione di malattia è risultata significativamente associata a LPS. Il gruppo sano aveva in media un valore stimato di LPS pari a 0.34 (IC95%: 0.08-0.59) mentre nei malati il valore era di 0.92 (IC 95%: 0.76-1.08). In caso di malattia il valore di LPS risultava in media maggiore di 0.58 (CI 95%: 0.28-0.88; p<0.001).
È stato individuato un valore di cut-off per gli LPS pari a 0.44.

In figura 2 viene riportato il modello di sensibilità-specificità costruito per l'individuazione del cut-off.

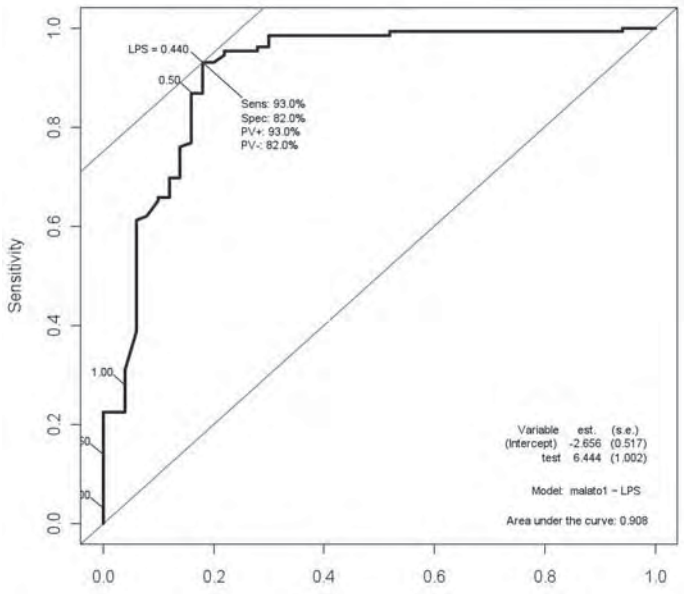


Figura 2. Modello per l'individuazione del cut-off.
Figure 2. Model for the cut-off construction.

Discussione

I risultati hanno evidenziato livelli di LPS mediamente superiori negli animali affetti da deperimento rispetto agli animali sani. In particolare è stato possibile individuare un livello di cut-off di 0,44 EU/ml al di sopra del quale ritroviamo gli animali ammalati e al di sotto del quale i sani.
È evidente che la bontà dell'analisi è strettamente legata al disegno di studio e alla definizione degli animali veri positivi e veri negativi individuati attraverso il disegno sperimentale.
Il valore ottimale identificato è quello che massimizza Se e 1-Sp. Tuttavia la scelta del cut-off dipende dall'intendimento che si ha di evidenziare quanti più veri positivi possibili anche a discapito dei falsi positivi oppure no. Con il livello scelto la sensibilità è del 93% e la specificità del 82%.
I risultati riportati nel presente lavoro confermano analoghe ricerche degli autori (dati non pubblicati) dove, in allevamenti guariti da forme di deperimento multi sistemico post-svezzamento, animali sani del settore svezzamento presentavano livelli di LPS inferiori rispetto a quelli degli animali colpiti dalla malattia nel corso del focolaio. Gli effetti determinati dalla presenza degli LPS nel torrente circolatorio potrebbero spiegare fenomeni cardiovascolari e segni anatomopatologici di morte da shock in soggetti deceduti affetti da sindromi di deperimento. Nel presente studio la diagnosi e la definizione del focolaio di malattia da deperimento è stata ascritta genericamente alle forme di deperimento assimilabili alla PMWS da un punto di vista anamnestico, clinico e anatomopatologico, ma senza una diagnosi di certezza attraverso la valutazione della presenza di lesioni istologiche tipiche e la presenza in situ di PCV2. L'obiettivo del lavoro era, infatti, indagare la correlazione tra la presenza di deperimento multistemico non ascrivibile a cause zootecniche o a un patogeno specifico e il livello di LPS circolanti.
Non sorprende l'assenza di correlazione tra i livelli delle citochine studiate e il livello di LPS. L'andamento dei livelli di citochine ematiche è molto rapido ed è probabile che in animali non infettati sperimentalmente ma con infezione naturale il prelievo ematico sia avvenuto in momenti diversi della cascata di citochine, rendendo difficile una loro valutazione.

Conclusioni

Il presente studio ha evidenziato livelli statisticamente più elevati di LPS nel torrente circolatorio negli animali colpiti da forme di deperimento rispetto ad animali clinicamente sani. Questi dati rappresentano i primi riscontri di campo relativamente allo studio delle endotossine circolanti nei suini e necessitano di ulteriori approfondimenti mirati a meglio chiarire il loro ruolo nelle dinamiche della malattia e nella induzione della morte nell'animale.

La ricerca è stata finanziata con i fondi del Progetto di Ricerca Corrente 16/2004

Bibliografia

ALLAN G., KENNEDY S., MCNEILLY F., FOSTER J., ELLIS J., KRAKOWKA S., MEEHAN B. & ADAIR B. (1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. Journal of Comparative Pathology 121, 1-11

BERCZI I., BERTOK L. & BEREZNAI T. (1966) Comparative studies on the toxicity of escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. Canadian Journal of Microbiology 12, 1070-1071

CHANG H. W., PANG V. F., CHEN L. J., CHIA M. Y., TSAI Y. C. & JENG C. R. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. Veterinary Microbiology 115, 311-319

CLARK E.G. (1997) Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners , 499-501

FORT M., FERNANDES L. T., NOFRARIAS M., DÍAZ I., SIBILA M., PUJOLS J., MATEU E. & SEGALÉS J. (2009) Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. Veterinary Immunology and Immunopathology 129, 101-107

MICHEL O. (2000) Systemic and local airways inflammatory response to endotoxin. Toxicology 152, 25-30

OLSON N., HELLYER P. & DODAM J. (1995) Mediators and vascular effects in response toendotoxin. British Veterinary Journal 151, 489-522

OPRIESSNIG T., MENG X. J. & HALBUR P. G. (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 19, 591

RAVIN H., ROWLEY D., JENKINS C. & FINE J. (1960) On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. Journal of Experimental Medicine 112, 783

VAN GUCHT S., LABARQUE G. & VAN REETH K. (2004) The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. Veterinary Immunology and Immunopathology 102, 165-178

VAN GUCHT S., VAN REETH K. & PENSAERT M. (2003) Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: Potentiation of cytokine production and respiratory disease. Journal of Clinical Microbiology 41, 960

VAN REETH K., NAUWYNCK H. & PENSAERT M. (2000) A potential role for tumour necrosis factor-{alpha} in synergy between porcine respiratory coronavirus and bacterial lipopolysaccharide in the induction of respiratory disease in pigs. Journal of Medical Microbiology 49, 613

SCROFE CONVENZIONALI FECONDATE CON SEME ARTIFICIALMENTE INFETTATO CON CIRCOVIRUS SUINO TIPO2 (PCV2)

CONVENTIONAL SOWS INSEMINATED WITH ARTIFICIALLY PCV2 INFECTED SEMEN

SARLI G., MORANDI F., PANARESE S., BACCI B., FERRARA D., FUSARO L., BACCI M.L., GOVONI N., DOTTORI M.[1], BONILAURI P.[1], LELLI D.[2], LEOTTI G.[3], VILA T.[4], JOISEL F.[4], OSTANELLO F.

Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna; IZSLER Reggio Emilia[1] e Brescia[2] ; Merial Italia S.p.A.[3]; Merial SAS, France[4]

Parole chiave: PCV2, infezione sperimentale, gravidanza, scrofe convenzionali.
Key Words: PCV2, experimental infection, pregnancy, conventional sows.

RIASSUNTO. Sei scrofe convenzionali sono state inseminate con seme sperimentalmente infettato con PCV2 mentre 3 soggetti con seme addizionato del solo terreno di coltura privo del virus. Solo 3 dei 6 animali sperimentalmente infettati sono risultati gravidi ad un controllo ecografico al 29° giorno post-inseminazione, mentre tutti i controlli sono risultati gravidi. La viremia è stata dimostrata in 4 soggetti su 6 del gruppo degli infetti che, rispetto al gruppo di controllo, hanno anche presentato titoli anticorpali anti PCV2 più persistenti. Il soggetto del gruppo degli infetti a più basso titolo anticorpale (1:100) all'inizio della sperimentazione ha mostrato la viremia più prolungata ed il maggiore numero di feti PCV2 positivi (10 su 16). In una placenta si è rilevata necrosi coaugulativa focale del chorion positiva all'indagine immunoistochimica per PCV2. Lo studio complessivamente ha permesso di dimostrare che: 1) l'esposizione intrauterina in suini convenzionali può riprodurre l'infezione; 2) un basso titolo anticorpale aumenta la probabilità di infezione; 3) l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, riduce la probabilità di gravidanza; 4) il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali.

ABSTRACT. Six conventional sows were inseminated with PCV2 added semen (infected) and three animals with semen and viral medium (controls). At ultrasonography (day 29 post insemination), only three out of the six infected animals were pregnant, unlike controls, all pregnant. Viremia was demonstrated in 4 out of 6 infected animals, along with a mean antibody titre higher only in exposed sows. Among infected, the sow with the lowest anti-PCV2 titre (1/100) at the beginning of the experiment, kept displaying positive blood results over time and had also the highest number of PCV2 positive foetuses (10/16).
One placenta displayed mild focal necrosis of the chorionic epithelium, positively stained by IHC for PCV2 antigen.The results obtained suggest that: 1) conventional sows can be infected by intrauterine exposition; 2) low antibody titres increase the probability of infection; 3) PCV2 infection close to insemination time reduces the pregnancy rate; 4) placental lesions may represent an additional cause of fetal suffering.

INTRODUZIONE

Il ruolo patogeno di PCV2 è stato accertato per la prima volta nel 1998 in Canada dove fu associato alla sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (*post-weaning*

multisystemic wasting syndrome - PMWS). Da allora, il coinvolgimento di PCV2 è stato riconosciuto anche in altre forme patologiche del suino quali: la sindrome dermatite nefrite (PDNS), alcune malattie respiratorie del suino (inclusa la polmonite proliferativa e necrotizzante - PNP), la linfadenite necrotizzante e l'enterite granulomatosa (Harding, 2004; Chae, 2005, Ségales *et al*., 2005). Tutte queste patologie sono ora identificate dall'acronimo PCVDs (*porcine circovirus diseases*).
Negli ultimi anni sono state annoverate fra le PCVDs anche alcune patologie riproduttive. Le prime segnalazioni di campo in Canada (West *et al*., 1999; O'Connor *et al*., 2001) e in Danimarca (Ladekjaer-Mikkelsen *et al*., 2001) ed il primo studio organico sull'argomento nel Nord Italia nel 2004 (Corradi *et al*., 2004) sono relative all'isolamento di PCV2 da prodotti di aborto/natimortalità. Da allora molta attenzione è stata rivolta, sia con indagini epidemiologiche mirate, sia con infezioni sperimentali, a definire il possibile ruolo rivestito da questo virus nella patologia riproduttiva del suino. E' stato dimostrato che un fattore di rischio importante per la patologia riproduttiva indotta da PCV2 è rappresentato da un episodio viremico che si realizza in una scrofa gravida con basso titolo anticorpale specifico (Calsamiglia *et al*., 2007). La viremia è infatti un fattore cruciale della trasmissione del virus dalla madre ai feti. Inoltre, tanto più a lungo questa si protrae, maggiore è la probabilità che tale evento si realizzi (Sanchez, 2003).
La viremia è il mezzo più frequente con cui PCV2 raggiunge l'embrione/feto; tuttavia, è stato dimostrato che PCV2 può infettare i prodotti del concepimento anche veicolato da seme o ovuli infetti (Cariolet *et al*., 2001; Bielansky *et al*., 2004; Mateusen, 2007), o come conseguenza dell'infezione delle vie genitali (Bielansky *et al*., 2004). Oltre che mediante trasmissione verticale con i gameti, il virus può raggiungere i prodotti del concepimento attraversando la placenta, sia con meccanismo diretto (cioè con particelle virali libere nell'interstizio), sia veicolato da cellule, in particolare macrofagi, capaci di mascherare il virus ai meccanismi di controllo immunitario anche in animali sieropositivi (Pensaert *et al*., 2004).
Numerosi lavori sperimentali hanno valutato il possibile ruolo di PCV2 nel determinismo di patologie riproduttive: infezioni sperimentali con inoculazione virale per via trans-uterina (Johnson *et al*., 2002), infezione per via oro-nasale di scrofe SPF (Cariolet *et al*., 2001) o convenzionali (Park *et al*., 2005), inoculazioni endouterine di scrofe SPF (Rose *et al*., 2007).
Scopo del presente studio è stato quello di valutare: a) la possibilità di infettare scrofe convenzionali mediante l'utilizzo di seme contenente PCV2 e, b) il ruolo di PCV2 nella fase iniziale e intermedia di gravidanza.
Il protocollo sperimentale impiegato riproduce quanto potrebbe accadere in allevamento: un recente studio condotto in Austria e Germania ha infatti dimostrato una significativa prevalenza di PCV2 (18,2%) nel seme (Schmoll *et al*., 2008).

Materiali e metodi

Animali

Nove scrofette Large White (95 kg di p.v., sei mesi di età), sono state acquistate presso un allevamento commerciale, acclimatate per cinque giorni e suddivise in due gruppi: controlli (gruppo C, 3 animali, identificati, singolarmente, come scrofa C28, C30 e C31) e infetti (gruppo I, 6 soggetti, I25, I26, I27, I29, I32, I33). I soggetti sono stati stabulati in *box* singoli e alimentati due volte al giorno con una razione di mangime da gestazione. I due gruppi in sperimentazione sono stati stabulati in due locali diversi e sono state garantite rigorose misure di biosicurezza.

Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale per lo studio è stato approvato dal Comitato Etico e Scientifico dell'Università di Bologna.

Il criolisato contenente il virus è stato prodotto a partire da una coltura di cellule PK-15 infettate con un ceppo di PCV2 isolato in Italia nel corso di un focolaio di PMWS. Il virus utilizzato per l'inoculo aveva un titolo di $10^{3.9}TCID_{50}$/ml valutato mediante immunofluorescenza indiretta usando un anticorpo monoclonale contro PCV2.

Il materiale seminale è stato prelevato da un verro di razza Large White presente nello stabulario del Dipartimento di Morfofisiologia e Produzioni Animali (DIMORFIPA) della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna.

Preliminarmente, è stata valutata l'assenza di PCV2 nel materiale seminale, la motilità e la concentrazione degli spermatozoi, nonchè la possibile citotossicità della sospensione virale utilizzata per l'infezione. Sono state quindi preparate 9 dosi di materiale seminale, ciascuna costituita da 3 x 10^9 spermatozoi/100 ml, in Androhep EnduraGuard (Minitube, Tiefenbach, Germany). Sei dosi sono state addizionate con 10 ml di sospensione virale, e tre dosi con 10 ml di terreno di coltura, privo di virus (controllo). Le dosi sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente prima della inseminazione artificiale (IA).

La sincronizzazione dell'estro è stata ottenuta somministrando per via intramuscolare eCG alla dose di 1500 UI/scrofa e, dopo 60 ore, hCG alla dose di 750 UI/scrofa. Quaranta ore più tardi gli animali sono stati inseminati, utilizzando un catetere tipo Melrose, con una singola dose: le 6 scrofe del gruppo I hanno ricevuto seme infettato sperimentalmente; i 3 animali del gruppo C hanno ricevuto il seme addizionato del solo terreno di coltura (controlli).

Giornalmente sono stati registrati la temperatura rettale e la presenza di eventuali segni clinici e/o di ritorno in estro.

Due giorni prima della fecondazione (giorno -2), da ciascuna scrofa sono stati realizzati tamponi vaginali, nasali e rettali, ed è stato prelevato un campione ematico. Successivamente gli stessi prelievi sono stati eseguiti con cadenza settimanale fino al 52° giorno post-inseminazione (DPI). Al fine di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza (giorni 13-18), le scrofe non sono state sottoposte a prelievo ematico il 14° giorno post-inseminazione. Lo schema del campionamento è riportato in Tabella 1. Al 29° giorno di gestazione, tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame ecografico. Le scrofe non gravide sono state sacrificate, mentre gli animali gravidi sono invece stati soppressi al 52° (C31), 55° (I25 e I26) e 56° (C28 e I29) giorno.

In tutti gli animali è stata inoltre valutata la concentrazione del progesterone ematico (P4), nell'arco di tempo compreso tra l'inizio della sperimentazione ed il 28° giorno, ad eccezione delle scrofe non gravide, testate fino al giorno della soppressione. La valutazione è avvenuta attraverso dosaggi radioimmunologici: aliquote di siero da 200 μl sono state estratte con 5 ml di etere di petrolio; l'etere è stato separato ed evaporato sotto un getto di N_2; gli estratti sono quindi stati risospesi in 1 ml di tampone fosfato testandone aliquote da 100 μl. La sensibilità del saggio è pari a 1.0 pg/aliquota e i risultati vengono espressi in ng/ml (Tamanini *et al*. 1985).

Alla necroscopia sono stati prelevati campioni dei seguenti tessuti: tonsilla, linfonodi (inguinali superficiali, uterini e tracheo-bronchiali), ileo, milza, fegato, rene, utero, salpinge, ovaie, vagina, polmone, cuore. I feti sono stati numerati, pesati e ne è stata valutata la lunghezza e da ciascuno, infine, si sono prelevati liquido amniotico, placenta (con tratto uterino corrispondente), fegato, milza e cuore.

Aliquote dei campioni sono state utilizzate per: 1) la ricerca del genoma virale mediante real time PCR (RT-PCR) e PCR qualitativa; 2) l'indagine istopatologica su un prelievo speculare (la metà opposta al campione usato per la RT-PCR) fissato in formalina tamponata al 10%,

incluso in paraffina e colorato con ematossilina ed eosina (H-E) e metodica immunoistochimica per PCV2.
Sui tessuti fissati in formalina è stata realizzata una colorazione immunoistochimica con l'ausilio di anticorpi anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1/100 in tampone fosfato, forniti dal Dr. G. Allan (Veterinary Sciences Division, Belfast, UK), secondo il metodo descritto da Sarli *et al*. (2009), modificato utilizzando un complesso di rilevazione streptavidina-biotina-perossidasi polimerico (SuperPicture kit peroxidise, Zymed® Lab).

Indagini sierologiche
Sui sieri prelevati lungo l'intero periodo di osservazione è stata condotta la determinazione dei titoli anticorpali anti PCV2; sui sieri prelevati ai giorni -2 e al giorno della soppressione della scrofa è stata condotta anche la ricerca di anticorpi anti PPV, ADV e PRRSV. La ricerca di anticorpi nei confronti di, PCV2, PPV, PRRSV e ADV è stata effettuata utilizzando ELISA competitive standardizzate presso I'IZSLER di Brescia (Brocchi *et al*., 1990, Cordioli *et al*., 1996, Sala *et al*., 2000).
Dai tamponi e dal sangue prelevati durante l'intero periodo di sperimentazione è stata effettuata la ricerca mediante PCR del genoma virale di PCV2; dai tamponi e dal sangue prelevato al giorno -2 è stata effettuata anche la ricerca del genoma di PRRSV, PPV e ADV.

Metodica PCR
Relativamente a PCV2, l'acido nucleico virale è stato estratto dai campioni (siero, tamponi e tessuti) mediante Trizol LS (Invitrogen), in accordo con le istruzioni del produttore. L'amplificazione è stata condotta in accordo con il protocollo proposto da Olvera *et al*. (2004).
Per PRRSV, PPV, ADV sono stati rispettivamente seguiti i protocolli descritti da Bonilauri *et al*. (2003), Katz e Petersen (1992) e Kim *et al*. (2001).

RISULTATI
A quaranta ore dalla somministrazione di hCG, in tutte le scrofe sono stati riscontrati segni di estro, ad esclusione del soggetto C31, già in estro al momento della sincronizzazione. Segni visibili di ritorno in estro si sono osservati soltanto nell'animale C31, a 15 giorni post-inseminazione, giorno in cui è stato nuovamente inseminato. Tale giorno è stato quindi assunto come giorno zero post-inseminazione solo in questo animale.
Al 23° giorno, la scrofa C30 ha abortito: gli embrioni e i rispettivi invogli sono risultati negativi alla ricerca del genoma di PCV2.
Al 29° DPI, l'indagine ecografica, ha confermato che cinque scrofe (I25, I26, I29, C28 e C31) erano gravide. Le tre non gravide (I27, I32, I33) che al 21° DPI non hanno avuto segni evidenti di estro non hanno presentato un aumento del progesterone ematico fino al 28° DPI.
Come riportato nella figura 1, nei soggetti I27 e I32 non sono state osservate variazioni nel titolo del P4 fino ai giorni 42 e 28, rispettivamente (quindi non è possibile dimostrare l'estro nei giorni precedenti). I valori di P4 sono andati invece aumentando nel soggetto I33 dopo il 35° giorno, possibile espressione di estro dopo il 35°, seppur senza segni clinici evidenti.
Non è stato evidenziato nessun incremento dei titoli sierologici per PPV, ADV, PRRSV nei prelievi eseguiti a inizio e fine sperimentazione. Analogamente, nessun soggetto è risultato viremico per gli stessi agenti.
I titoli anticorpali all'inizio della sperimentazione (-2 DPI) per PCV2 erano elevati (intervallo 1/1000 -1/10000) in tutti gli animali, tranne in una scrofa, I25, (1/100).
L'andamento dei titoli anticorpali per PCV2 durante il periodo di sperimentazione ha evidenziato una diminuzione (seppur non significativa) già al secondo prelievo (giorno 7)

negli animali del gruppo C; al contrario, i soggetti del gruppo I hanno mostrato valori più elevati, con diminuzione soltanto dopo il 42° giorno.
La ricerca del genoma di PCV2 nel siero ha dato esito positivo, ai giorni 7, 21, 28 e 35, nei soli animali del gruppo I (scrofe I25, I27, I29, I32). La scrofa I25, con basso titolo di anticorpi per PCV2, ha presentato viremia sia al 21° che 35° giorno, con valori compresi tra $1{,}10x10^3$ copie genoma/ml e $8{,}0x10^4$ copie genoma/ml ed un numero medio di cicli di RT-PCR che si è attestato intorno a 36; questo animale è stato l'unico ad eliminare il virus (positività di un tampone rettale al 35° giorno, con segnale al 37° ciclo con un risultato di $2.93x10^3$ copie genoma/ml).
Gli organi dei 6 animali infettati hanno evidenziato positività in RT-PCR in diversi tessuti (Tabella 2): con valori oscillanti tra $1{,}01x10^3$ copie genoma/ml e $5{,}40x10^6$ copie genoma/ml (con numero medio di cicli intorno a 32). Un unico picco ($4{,}01x10^8$ copie genoma/ml) è stato osservato in un solo pool feto/placenta della scrofa I25 (feto/placenta n°16) a 21 cicli. Inoltre, la scrofa I25 ha presentato oltre ad un elevato numero di feti positivi per PCV2 (10 su 16), anche un'elevata concordanza di positività tra feto e tratto uterino corrispondente (8 casi su 10).
Alla necroscopia si è osservata presenza di pleurite cronica fibrosa di grado lieve-moderato in quattro animali (I26, I32, C28, C30,); inoltre, tre casi di pericardite (in I26 e C30 di grado lieve, cronica, fibrosa; in C31 sierosa). La scrofa I29 ha presentato polmonite enzootica bilaterale cranio-ventrale. Sono stati osservati inoltre, un caso di peritonite siero-fibrinosa (I27) lieve e due casi (I32, C31) di epatite interstiziale multifocale lieve (fegato a macchie bianche). Tre soggetti hanno presentato lievi erosioni multifocali a carico dello stomaco. Edema e congestione della mucosa sono state le sole lesioni uterine rinvenute durante la necroscopia di due soggetti (C30 e I33) non gravidi.
Le scrofe gravide del gruppo I hanno presentato rispettivamente: 16, 11 e 7 feti, mentre i due controlli 11 e 8 (Tabella 2). Non sono state rilevate lesioni macroscopiche a carico dei feti.
Microscopicamente, in una sola placenta della scrofa I25, risultata positiva in RT-PCR per PCV2 con il più alto titolo virale ($>10^8$), si è osservata una necrosi coagulativa focale dell'epitelio del chorion. Alcune cellule di quest'ultimo hanno mostrato positività immunoistochimica, di intensità lieve, per PCV2, con segnale localizzato a livello citoplasmatico. Inoltre, nel feto corrispondente si è registrata debole immunopositività per lo stesso agente nel citoplasma di alcuni epatociti.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di trasmissione dell'infezione da PCV2 mediante l'impiego di seme infetto: 4 scrofe su 6 hanno presentato viremia rilevabile a partire dal 7° DPI. Inoltre, nel corso della sperimentazione, il titolo anticorpale anti PCV2 si è mantenuto più elevato per un periodo di tempo più lungo nei soli soggetti infetti, come probabile conseguenza della esposizione al virus. Tre animali infettati su 6 non sono risultati gravidi (nessun segno di ritorno in estro, nessun segno evidente di aborto) a differenza delle scrofe di controllo, tutte gravide anche se una ha abortito per cause non imputabili al PCV2. Nelle 3 scrofe non gravide del gruppo I, il dosaggio del progesterone ha dimostrato che la scrofa I33 aveva già ovulato quando è stata eseguita l'inseminazione, mentre le altre 2 (I27, I32) presentavano una condizione endocrinologica ottimale per la fecondazione, analogamente alle altre 3 scrofe del gruppo I e agli animali del gruppo C. La mancata gravidanza, unitamente alla dimostrazione di avvenuta infezione (viremia) in entrambi i soggetti del gruppo I risultati non gravidi, potrebbe far ipotizzare un possibile ruolo di PCV2 come causa di morte embrionale precoce. Nella sperimentazione, le scrofe non gravide sono rimaste in vita fino ad almeno il 29° giorno, senza manifestare evidenza di calore o incremento dei livelli ematici di progesterone.
Il modo più frequentemente utilizzato, in modelli sperimentali, per produrre l'esposizione dei

feti è quello di causare un episodio viremico in scrofe gravide (Cariolet *et al*., 2001; Park *et al*., 2005). Il modello sperimentale impiegato in questo studio ha avuto lo scopo di valutare se l'impiego di seme infetto potesse avere conseguenze più gravi sulla gravidanza e/o sul feto, in funzione della possibilità di moltiplicazione locale (uterina) del virus e quindi di esposizione nelle fasi iniziali della gravidanza, rispetto ad un evento viremico primario. Le viremie nei soggetti infetti sono state registrate piuttosto tardivamente (prevalentemente dal 21° giorno in poi) suggerendo che la moltiplicazione in utero è solo transitoria e non amplifica molto la carica virale. Verosimilmente, la viremia è stata la conseguenza del raggiungimento di organi bersaglio più idonei alla replicazione virale, come il tessuto linfoide che, quindi, con il tempo, ha garantito e mantenuto la viremia stessa. Sembra quindi ipotizzabile, anche alla luce di quanto asserito da Segalés *et al*. (2007), che le vie genitali non siano un sito usuale di moltiplicazione del PCV2. In tal senso, l'entrata del virus con il seme non rappresenterebbe tanto un momento importante di esposizione, quanto piuttosto un evento prodromico per un possibile raggiungimento di organi bersaglio più idonei. In quest'ottica l'immunità gioca un ruolo importante nel ridurre la quantità di virus che può raggiungere i tessuti linfoidi prima e che attraverserà la placenta dopo. Ciò poiché la diffusione del virus agli organi bersaglio e la conseguente viremia vengono ostacolate dal titolo anticorpale anti-PCV2 (Calsamiglia *et al*., 2007). A conferma di ciò, la scrofa I25, che presentava il più basso titolo anticorpale anti PCV2 al giorno -2, ha mostrato non solo viremia (in due prelievi successivi, giorno 21 e 35) ed eliminazione fecale, ma anche numerosi tessuti positivi, oltre che 10 feti positivi su 16 di cui per 8 vi era concordanza tra feto positivo e tratto uterino corrispondente.
E' noto in letteratura (Sanchez *et al*., 2003) come l'esposizione in utero al PCV2 non determini l'infezione di tutti i feti, risultato registrato anche nel nostro esperimento. Inoltre, i risultati prodotti sembrano dimostrare che PCV2 non si replichi soltanto nei tessuti fetali, come riportato in letteratura, ma anche nelle cellule dell'epitelio del chorion, rappresentando una causa di necrosi condizionante la morte fetale con natimortalità/mummificazione. Quindi anche per il PCV2, analogamente a quanto riportato in talune patologie a diversa eziologia (Foster, 2007) anche le lesioni placentali si possono considerare il substrato anatomoistopatologico della patologia riproduttiva.
Infine, l'evidenziazione con l'immunoistochimica (IHC) di un solo campione (feto e placenta) su molti positivi alla PCR concorda con quanto descritto da Brunborg *et al*. (2004), i quali hanno dimostrato che il limite di sensibilità dell'IHC si abbia per campioni con una carica virale maggiore di 10^8 copie di genoma, esattamente quanto è avvenuto nell'unico caso positivo all'IHC osservato nel presente lavoro.

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di dimostrare che: 1) l'esposizione intrauterina in suini convenzionali può riprodurre l'infezione; 2) un basso titolo anticorpale aumenta la probabilità di infezione, dimostrando un ruolo protettivo degli anticorpi anti-PCV2 anche qualora la via di ingresso sia quella endouterina; 3) l'infezione da PCV2 contestualmente alla fecondazione, sembra ridurre la probabilità di gravidanza; 4) il substrato anatomoistopatologico della sofferenza fetale va individuato anche in lesioni placentali.
Se si accetta l'ipotesi, già parzialmente verificata, che PCV2 possa rivestire un ruolo importante nella patologia riproduttiva del suino, è evidente che le conoscenze relative alla prevalenza dell'infezione tra i riproduttori, ai fattori di rischio aziendali e alla patogenesi del danno sui prodotti del concepimento, diventano cruciali per la pianificazione di misure di controllo tendenti a minimizzare i danni o a controllare l'infezione. Dai dati emersi in questo studio risulta critico il livello anticorpale della popolazione in esame.

Studio condotto con finanziamento MERIAL sas, Lione, Francia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bielansky A., Larochelle R., Argyle J., Magar R. (2004). Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody-positive pigs. Vet Rec 155, 597-598.
2. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, pp.98-99.
3. Brocchi, E., Berlinzani, A., Callegari, S., Gamba, D., Civardi, A. (1990). Realizzazione di un test ELISA-competizione per distinguere animali infetti da virus di Aujeszky da animali vaccinati con vaccini gI-deleti. Atti Società Italiana Scienze Veterinarie 44, 913–917.
4. Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martìn M., Mateu E., Domingo M., Segalés J. (2007). Sow porcine circo virus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Res Vet Sci 82, 299-304.
5. Cariolet R., Blanchard P., Le Dimna M., Mahé D., Jolly I.P., de Boisséson C., Truong C., Echobichon P., Madec F., Jestin A. (2001). Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. Proc. of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates, Saint-Malo, p. 128.
6. Chae C. (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J 169, 326-336.
7. Cordioli, P., Sala, G., Brocchi, E., Gamba, D., De Simone, F., (1996). Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, p. 86.
8. Corradi A., Dottori M., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A,M., Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E.: Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto. Atti XXX Meeting Annuale SIPAS, 215-221, 2004.
9. Foster R., (2007). Female reproductive system. In McGavin and Zachary "Pathologic basis of Veterinary Diseases" cap. 18, IV Ed., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1290-1303.
10. Harding J.C.S. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. Vet Microbiol 98, 131-135.
11. Johnson C.S., Joo H.S.,Direksin K., Yoon K.J., Choi Y.K. (2002). Experimental in utero inoculation of late-term swine foetuses with porcine circovirus type 2. J Vet Diagn Invest 14, 507-512.
12. Katz J.B., Pedersen J.C. (1992). Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms. Biologicals 20,187-195.
13. Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. Vet Rec.149, 304-5.
14. Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Nielsen J., Storgaard T., Bøtner A., Allan G., McNeilly F. (2001). Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. Vet Rec 148, 759-760.
15. Mateusen B., Maes D.G., Van Soom A., Lefebvre D., Nauwynck H.J. (2007). Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. Theriogenology 68, 896-901.
16. 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 Methods 117, 75-80.
17. Park J.S., Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Lim J.K., Kim S.H., Chae C. (2005). Birth

abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. J Comp Pathol 132, 139-144.
18. Rose N., Blanchard P., Cariolet R., Grasland B., Amennay N., Oger A., Durandz B., Balaschy M., Jestin A., Madec F. (2007). Vaccination of porcine circovirus type 2 (PCV2)-infected sows against porcine parvovirus (PPV) and erysipelas: effect on post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. J Comp Pathol 136, 133-144.
19. Sala, G., Rigola, S., Alborali, G.L., Brocchi, E., Cordioli, P. (2000). Development of monoclonal antibodies based ELISAS for the detection of antibodies against porcine circovirus type 1 and type 2. In: Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, pp. 253–254.
20. Sanchez R.E., Meerts P., Nauwynck H.J., Penseart M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early post-natal life. Vet. Microbiol 95, 15-25.
21. Segales J., Allan G.M., Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. Animal Health Research Review 6, 119-142.
22. Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. (2008). Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. Theriogenology 69, 814-821.
23. Tamanini C., Bono G., Cairoli F., Chiesa F. (1985). Endocrine responses induced in anestrous goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment. Anim Reprod Sci 9, 357-364.

Tabella 1: Schema temporale dei campionamenti e tipo di test su di essi eseguito.
Table 1: Samplings and lab tests planning.

	Giorni post-inseminazione										
Campioni e test di laboratorio	-2	7	14	21	28	35	42	49	52*	55*	56*
PCR tamponi (vaginale, rettale, nasale)	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
PCR sangue	PCV2 PRRSV PPV ADV	PCV2	/	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
Sierologia**	PCV2	PCV2	/	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2	PCV2
N° identificativo	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte le scrofe	tutte eccetto C30, C32	tutte eccetto C30, C32	I25, I26, C28, I29, C31	C31	I25, I26	C28, I29

Note: * prelievi realizzati prima dell'eutanasia nella scrofa identificata nell'ultima riga in basso.
** al giorno -2 DPI e al giorno dell'eutanasia è stata eseguita la titolazione anticorpale anche per PRRSV, PPV e ADV.

Notes: * pre-euthanasia samplings.
** anti-PRRSV, PPV and ADV antibody titres were evaluated at -2 DPI and on suppression day.

Tabella 2: tessuti e feti testati in RT-PCR e relativi risultati.
Table 2: tissues and fetuses RT-PCR assessment and results.

	Scrofe gravide (gruppo I)			**Scrofe non gravide (gruppo I)**			**Scrofe di controllo (gruppo C)**		
Scrofa ID	25	26	29	27	32	33	28	30	31
Numero dei feti	16	11	7	0	0	0	11	0	8
Titolo sierico per PCV2*	$1/10^2$	$1/10^3$	$1/10^3$	$1/10^4$	$1/10^4$	$1/10^3$	$1/10^3$	$1/10^4$	$1/10^4$
Viremia al giorno**	21 e 35	-	21	7	28	-	-	-	-
Tonsilla	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino sinistro	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo uterino destro	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Linfonodo tracheo-bronchiale	+	-	-	/	-	/	-	-	-
Cervice	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Feti (pos/tot.)	10/16	-	3/7	-	-	-	-	-	-
Liquido amniotico (pos/tot.)	-	1/11	-	-	-	-	-	-	-
Feto e tratto uterino corrispondente (sinistro)	8***	-	-	-	-	+	-	-	-
Feto e tratto uterino corrispondente (destro)	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: *si riferisce al titolo sierico per pcv2 ad inizio sperimentazione; ** viene indicato il giorno/i di prelievo dopo la inseminazione; *** dei 16 tratti uterini, corrispondenti ognuno ad un feto, in 8 campioni la PCR per l'utero era positiva, ma solo in 7 casi vi era concordanza tra positività nell'utero e nel feto.

Notes: *serum titre at the starting of experimental study; ** DPI sampling when viremia was recorded; *** out of the 16 uterine tract samples, each corresponding to a fetus, 8 were PCV2 positive by PCR but only in 7 cases a concordance of the positive PCR result was revealed in both foetus and uterus tissues.

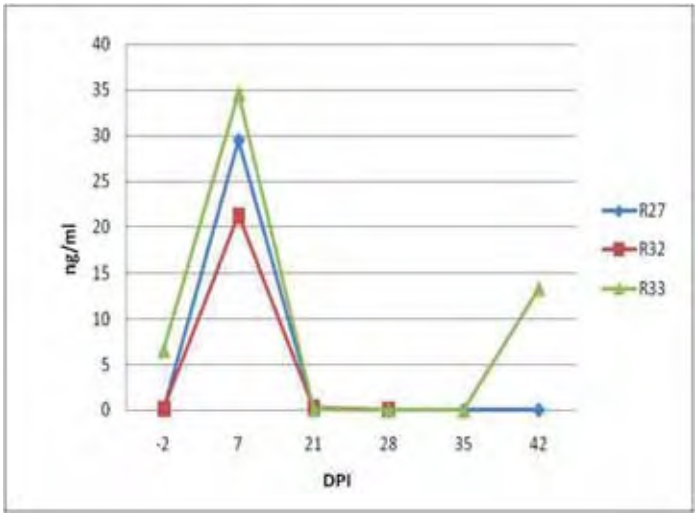


Figura 1: Scrofe non gravide: titolo sierico del progesterone (P4).
Figure 1: Non pregnant sows: progesteron (P4) serum levels.

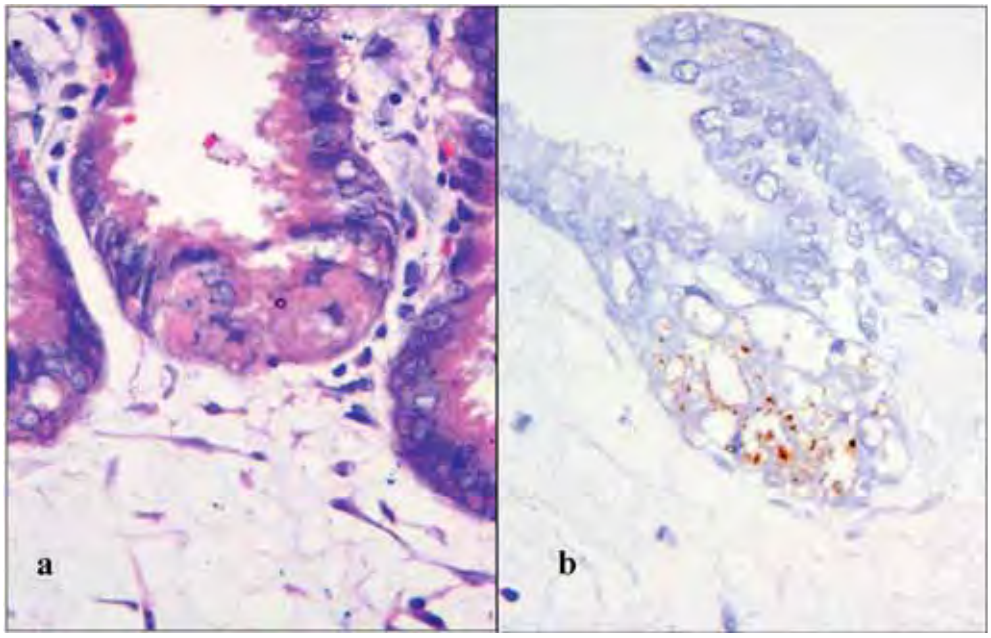


Figura 2: Scrofa. Placenta. Chorion. Focolaio di necrosi coaugulativa (a) positivo alla reazione imunoistochimica, colorazione marrone, per PCV2 (b). (a): Ematossilina-eosina, 40x; (b) reazione immunoistochimica per PCV2, 40x.
Figure 2: Sow. Placenta. Chorion. Coagulative necrosis (a) showing a brown, positive, immunohistochemical staining for PCV2 (b). (a): Haematoxylin-eosin, 40x; (b) immunohistochemistry to PCV2, 40x.

Qualità Garantita: Certezza di Risultati

Soluzioni fidate.

Elanco Animal Health
Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)

Elanco

Tel. 055 4257.031 -Fax 055 4257.068
www.elanco.com

STUDIO PRELIMINARE SULLA VARIABILITÀ GENETICA DEI CEPPI DI PCV2 ISOLATI TRA IL 1999 E IL 2002 E DAL 2007 AD OGGI.

PRELIMINARY STUDY ON THE GENETIC VARIABILITY OF PCV2 STRAINS ISOLATED IN THE 1999-2002 PERIOD AND SINCE 2007 UP TO NOW.

CANELLI[1] E., CATELLA[1] A., ALBORALI[2] L., SOZZI[1] E., LELLI[1] D., MORENO[1] A., FONTANA[1] R., CORDIOLI[1] P.

[1]Laboratorio di virologia; [2]Sezione Diagnostica IZSLER sede di Brescia

Parole chiave: PCV2a, PCV2b, PCR, PCVAD
Keywords: PCV2a, PCV2b, PCR, PCVAD

RIASSUNTO
Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un agente virale coinvolto nella PCVAD (porcine circovirus associated diseases), un problema globale ed emergente che crea notevoli perdite economiche nel settore dei suini. Il virus dal punto di vista filogenetico è stato classificato in due cluster: PCV2a e PCV2b (Gagnon *et al*., 2007). Gli studi sull'evoluzione genetica del PCV2 hanno assunto negli ultimi anni una maggiore importanza date le ipotesi sulla differente patogenicità dei due sottotipi. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare i ceppi isolati dal laboratorio di virologia dell'IZSLER di Brescia dal 2007 al 2009 e di confrontare i risultati ottenuti con quelli riguardanti gli isolati degli anni 1999-2002 nella stessa area. A tal fine, 36 ceppi di PCV2 isolati nei due periodi sopracitati, sono stati genotipizzati utilizzando una metodica PCR. Tutti i ceppi analizzati provenivano da aziende con anamnesi riferibile a PCVAD. I risultati ottenuti hanno permesso la suddivisione dei ceppi in 30 per il PCV2b, 2 per il PCV2a e 4 per entrambi i genotipi. È interessante notare che, a conferma di quanto descritto in altri paesi Europei, anche in Italia, l'isolamento del PCV2a appare irrilevante rispetto al 2b, che è il genotipo prevalente già nei focolai di PMWS del 1999.

ABSTRACT
Porcine circovirus 2 (PCV2) is associated with several diseases in pigs, all defined as PCVD (porcine circovirus associated diseases), that are now considered as a global problem causing significant economic losses in the swine industry. The virus has been classified by phylogenetic analysis into two genetic types of PCV2a (defined also as cluster 2) and PCV2b (cluster 1). Although the PCV2b was commonly associated with PMWS, there are only hypotheses about the differences in viral virulence between the two subtypes. In order to differentiate the two PCV2 subtypes, two polymerase chain reaction (PCR) assays were developed. In this study, 30 PCV2b strains, 2 PCV2a strains and 4 strains showing both genotypes on a total of 36 strains were detected. All the PCV2 strains were originated from farms with PMWS-anamnesis or from swine with pathological lesions. The results showed that the PCV2b is the prevalent genotype in both period in the analyzed area.

INTRODUZIONE
Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus, circolare, senza envelope, a DNA a singola elica, appartenente alla famiglia *Circoviridae,* coinvolto nel complesso PCVAD (Porcine CircoVirus Associated Diseases), un problema globale a livello di allevamenti intensivi suini.
La PMWS è stata identificata per la prima volta in Canada nel 1991 (Harding and Clark,

1997) ed è poi stata descritta anche in Europa a partire dal 1995 (Le Cann *et al*.,1997). Nel 2004 è stato osservato sempre in Canada un marcato aumento di focolai di PMWS clinica e ad elevata gravità. La stessa situazione è stata riportata anche in altri paesi del Nord Ovest dell'America, facendo sospettare l'introduzione di un ceppo di PCV2 con una maggiore patogenicità. Gli studi che seguirono identificarono, oltre al PCV2a (definito anche cluster genetico 2), un nuovo genotipo definito PCV2b (cluster 1), sporadico tra i ceppi di PCV2 antecedenti il 2004 e preponderante dopo questa data (Horlen *et al*., 2007; Gagnon *et al*., 2007; Cheung *et al*. 2007). Per questo motivo si ipotizzò che fosse proprio il genotipo 2b quello responsabile della forma clinica e della maggior gravità dei focolai, e che quindi fosse un nuovo tipo più virulento del 2a o derivato da questo mediante shift genetico. Studi successivi dimostrarono che il PCV2b era presente anche in allevamenti senza patologie PCV2-associate. Si pensò allora ad una variabilità tra ceppi appartenenti allo stesso genotipo (Opriessing *et al*., 2008), senza dimenticare la presenza di tutti i fattori concomitanti nel determinismo della patologia clinica.
Dal punto di vista genetico, il virus presenta 6 ORF. Le principali sono ORF1 (codificante per *Rep,*) ORF2 (che codifica per *Cap*) e ORF3 (associata a apoptosi cellulare e a patogenicità in vivo). Filogeneticamente l'omologia tra PCV2a e PCV2b sull'intero genoma è del 97.5%, mentre è del 92.2% quella nucleotidica a livello di *Cap* (Opriessing et al., 2008). La tecniche di differenziazione tra i due genotipi si basano quindi principalmente sull'analisi di un frammento della ORF2. Questo gene codifica per il capside, che è la più importante componente virale esterna che stimola la risposta immunitaria. L'ipotesi di una variabilità genetica associata a una differente virulenza, oltre al fatto che genotipi diversi possano indurre una minore o mancata cross protezione immunitaria, hanno portato ad un aumento degli studi sull'evoluzione genetica del PCV2. Sulla base dei dati sopra riportati, nel presente lavoro è stata eseguita la sottotipizzazione di ceppi di PCV2 isolati da campioni patologici conferiti presso il laboratorio di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) sia nei primi anni dopo la comparsa della PMWS (1999-2002), sia negli ultimi tre anni.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati utilizzati omogenati di tessuti (prevalentemente organi linfatici) di soggetti conferiti presso la sezione diagnostica o il reparto di virologia dell'IZSLER di Brescia nei periodi di tempo compresi tra il 1999 e il 2002 e tra il 2007 e il 2009. Il campionamento è stato eseguito con lo scopo di valutare la prevalenza dei due sottotipi a distanza di anni e in situazioni cliniche ed epidemiologiche differenti.
In totale sono stati esaminati 36 ceppi, 24 del primo periodo e 12 del secondo. Gli allevamenti di suini dai quali provenivano i materiali patologici per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola. Gli animali campionati presentavano la forma clinica o erano animali infetti, che pur in presenza di viremia non presentavano i caratteri clinici ed anatomopatologici delle PCVAD; in generale l'anamnesi di allevamento era riconducibile a PCVAD.

Isolamento e immunofluorescenza

Il materiale patologico è stato estratto in MEM-A, centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato seminato su colture cellulari NLPK PCV-free. Per ogni campione sono stati fatti tre passaggi, il terzo passaggio è stato poi analizzato in immunofluorescenza indiretta per valutare la crescita del virus (Fig. 1), utilizzando un pool di anticorpi monoclonali (mAb) specifici per PCV2 (3B11; 4H8; 2A11) (Rigola *et al*., 2000).

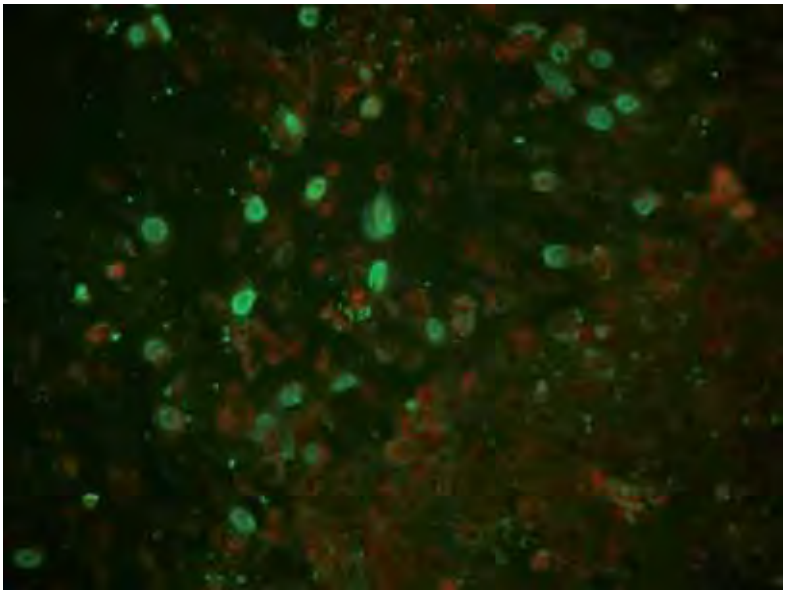


Fig.1 Tessutocoltura di NLPK infette. Immunofluorescenza positiva per PCV2
Fig.1 *NLPK cells infected with sample. PCV2-positive immunofluorescence reaction*

PCR
Per la ricerca del DNA virale sono stati impiegati primer specifici per amplificare una porzione della ORF2, in grado di differenziare i due sottotipi, secondo la metodica descritta da Horlen *et al*., 2007, e modificata. Le sequenze dei primer sono riportate nella tabella 1, in particolare il primer forward è comune ad entrambi i sottotipi mentre sono differenti i primer reverse.

Primer	***sequenza (5'--3')***
ARev PCV2a	GGGGGACCAACAAAAATCTC
AFor PCV2	CAGTTCGTCACC
ARrev PCV2b	GGGGCTAAACCCCCGCTC

Tab. 1 Primers impiegati
Tab. 1 *Primers*

Il DNA virale è stato estratto partendo da 200μl di surnatante della tessuto coltura mediante un protocollo interno che prevede l'uso di trizolo. Per entrambe le reazioni sono stati utilizzati 0,25 μM di ciascun primer, 2μl di $MgCl_2$ 25μM, e 0,3μl di TAQ 5U/μl in 25μl finali. Il DNA è stato poi amplificato secondo il seguente profilo termico: 4 minuti a 95°C, 35 cicli di amplificazione (30 secondi a 95°C, 30 secondi a 54°C e 1 minuto a 72°C) ed un'estensione finale di 7 minuti a 72°C. Gli amplificati sono poi stati analizzati su gel di agarosio all'2% per valutare la presenza delle bande attese.

RISULTATI

Tra i ceppi analizzati la maggior parte è risultata appartenere al tipo 2b (94% sul totale) in entrambi i periodi (tab.2). I ceppi appartenenti al genotipo 2a sono stati rilevati solo tra gli isolati del primo periodo, in particolare due ceppi, provenienti dallo stesso allevamento, sono risultati positivi al solo tipo 2a (5.6%), mentre 4 isolati presentavano entrambi i genotipi (11.1%).

	Conferimento	***anno***	***provenienza***	***genotipo***
1.	9264	1999	MN	2b/2a
2.	9367		BS	2b/2a
3.	9964-1		PC	2a
4.	9964-2		PC	2a
5.	9261		BS	2b
6.	9945		MN	2b
7.	9957		BS	2b/2a
8.	6503		MN	2b
9.	12601	2000	LO	2b/2a
10.	12877		PC	2b
11.	4179/2		BS	2b
12.	11995		BS	2b
13.	163	2001	FO	2b
14.	860		BS	2b
15.	798		PR	2b
16.	95788	2002	MN	2b
17.	94155		BS	2b
18.	108201		BS	2b
19.	113490		CN	2b
20.	111129		BS	2b
21.	121314		BS	2b
22.	117910		FE	2b
23.	126513		BS	2b
24.	124449-4		BS	2b
25.	75582	2007	CR	2b
26.	68054		BS	2b
27.	50355/6		CR	2b
28.	83959/1		CR	2b
29.	31075/2		CR	2b
30.	86533/19		BS	2b
31.	286922		BS	2b
32.	51140	2008	BS	2b
33.	181813		BS	2b
34.	230855	2009	BS	2b
35.	68054		BS	2b
36.	215216/2		BS	2b

Tab. 2 Campioni analizzati:numero identificativo, anno di isolamento, provenienza, tipo
Tab. 2 Analyzed samples: identification number, isolation year, origin, type

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti indicano che il PCV2b è il genotipo maggiormente rappresentato e, come già descritto in Francia e Olanda, è rilevabile fin dal 1999, al contrario di quanto riportato nei paesi nord americani, dove è stato individuato solo dopo il 2004.

Da sottolineare la co-presenza dei due sottotipi a livello dello stesso animale e dello stesso allevamento, che suggerisce come il singolo individuo possa infettarsi contemporaneamente con entrambi i genotipi, nonostante il PCV2b a livello di allevamento rimanga il predominante.

L'analisi è stata effettuata solo su campioni provenienti da suini con lesioni compatibili alle patologie PCV2-associate o da allevamenti con anamnesi di PMWS. La netta prevalenza del PCV2b, rafforza quindi l'ipotesi che sia il tipo associato alla comparsa di patologia clinica e quello che prevale in un'ipotetica competizione tra i due tipi virali, forse grazie a caratteristiche biologico - molecolari che ne permettono un più efficiente adattamento al suino in particolari condizioni. Per confermare questo risultato è in corso l'analisi di nuovi campioni da animali sani e da allevamenti senza precedenti di PCVAD, per valutare se siano presenti ceppi appartenenti ai due genotipi, indipendentemente dalla situazione clinica dell'allevamento.

Il metodo PCR utilizzato si è rivelato ottimale su surnatanti di tessuto-colture, ma è stato anche sperimentato sugli estratti originali di molti dei ceppi analizzati, mostrando di essere un comodo metodo di genotipizzazione. L'analisi sta tuttora proseguendo con studi di sequenziamento col fine di definire meglio l'associazione della genetica a distinte realtà di allevamento e alla gravità delle forme patologiche.

Inoltre i monoclonali utilizzati per l'identificazione degli isolati sono stati prodotti nei confronti di un ceppo appartenente al tipo 2a (ceppo PCV-2 032), e le ricerche in corso presso il nostro laboratorio hanno dimostrato che almeno uno dei tre mAbs ha proprietà neutralizzanti nei confronti di numerosi ceppi appartenenti ad entrambi i genotipi. Il passo successivo sarà quello di analizzare gli isolati anche dal punto di vista antigenico. Queste indagini avranno lo scopo di valutare se la risposta immunitaria nei suini all'infezione con uno specifico cluster genetico conferisca protezione, e in quale misura, nei confronti di un ceppo eterologo, considerando anche i risvolti nell'ambito della vaccinazione come strumento di protezione da patologie PCV2-associate.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.M., McNeilly F., McMenamy M., McNair I., Krakowka S.G., Timmusk S., Walls D., Donnelly M., Minahin D., Ellis J., Wallgren P., Fossum C., (2007). Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and non-affected farms in Ireland and Northern Ireland. J Vet Diagn Invest 19: 368-375.
2. Carman S., Cai H.Y., DeLay J., Youssef S.A., McEwen B.J., Gagnon C.A., Tremblay D., Hazlett M., Lusis P., Fairles J., Alexander H.S., van Dreumel T., (2008),The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. Can J Vet Res 72: 259-268.
3. Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R., Dunham A.G., (2007), Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. Arch Virol 152: 1035-1044.
4. de Boisseson C., Beven V., Bigarre L., Thiery R., Rose N., Eveno E., Madec F., Jestin A., (2004), Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. J Gen Virol 85: 293-304.

5. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E., (2008), Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet Microbiol 128: 56-64.
6. Gagnon C.A., Tremblay D., Tijssen P., Venne M.H., Houde A., Elahi S.M., (2007), The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. Can Vet J 48: 811-819.
7. Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., Lopez-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A., Segales J., (2008), A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. Vet Microbiol 128: 23-35.
8. Harding J.C.S. and Clark E.G., (1997), Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), J. Swine Health Prod. 5, pp. 201–203.
9. Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., (2008), Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. Virus Res 132: 201-207.
10. Horlen K.P., Schneider P., Anderson J., Nietfeld J.C., Henry S.C., Tokach L.M., Rowland R.R., (2007), A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. J Swine Health and Production 15: 270-278.
11. Le Cann P., Albina E., Madec F., Cariolet R. & Jestin A. (1997), Piglet wasting disease. Vet Rec 141, 660
12. Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann P., Jestin A., Segales J., Chmielewicz B., Plana-Duran J., Soike D., (2000), Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. Virus Res 66: 65-77.
13. Olvera A., Cortey M., Segales J., (2007), Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology 357: 175-185.
14. Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J., Halbur P.G., (2008), Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. J Gen Virol 89: 2482-2491.
15. Pesch S., Ohlinger V.F., (2007), Two subtypes of PCV2 are widely spread in European pig population causing PCVAD. Proc 5th Inter Symp Emerg and Re-emerg Pig Disease, Krakau, Polonia, 2007 p.81.
16. Rigola S., Sala G., Cordioli P., Lombardi G., (2000), Standardizzazione ed utilizzo di una metodica sierologica specifica per il circovirus suino tipo 2. Atti del XXVI meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini, Piacenza 24-25 marzo 2000, p.67-73
17. Wiederkehr D., Sydler T., Brugnera E., Buergi E., Sidler X., (2007), Different genotypes of porcine circovirus type 2 in immunohistologically positive Swiss pigs from 1986 to 2005. Proc 5th Inter Symp Emerg and Re-emerg Pig Disease p.84.
18. Wiederkehr D.D., Sydler T., Buergi E., Haessig M., Zimmermann D., Pospischil A., Brugnera E., Sidler X., (2009), A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. Vet Microbiol 136: 27-35.

RISULTATI PRELIMINARI SULL'ANALISI DEI GLICOSAMMINOGLICANI IN TESTICOLI SANI E CRIPTORCHIDI DI SUINO

PRELIMINARY RESULTS ON GLYCOSAMINOGLICAN ANALYSIS IN NORMAL AND CRYPTORCHID BOAR TESTES

[1] AMEDEO S., [1] CAPUCCHIO M.T., [3]APICELLA M., [1]GUARDA F., [2]MIOLETTI S.

[1] Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO) e Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Torino; [2]Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Grugliasco (TO); [3] CN 1 Regione Piemonte

Parole chiave: criptorchidismo, glicosamminoglicani, suino, testicolo
Key Words: boar, cryptorchidism, glycosaminoglycans, testis

RIASSUNTO
Il criptorchidismo è una delle più diffuse patologie riguardanti lo sviluppo dell'apparato genitale maschile nella specie umana, correlato spesso a complicazioni come infertilità, neoplasie e disturbi ormonali. I glicosamminoglicani sono macromolecole fondamentali della matrice extracellulare e rivestono moltissime funzioni fisiopatologiche nell'organismo. In questo lavoro abbiamo voluto analizzare dal punto di vista biochimico la composizione in glicosamminoglicani di testicoli normali e criptorchidi di suino, per evidenziare eventuali differenze tra tessuto sano e patologico.

ABSTRACT
Cryptorchidism is the most frequent defect of the male urogenital tract in humans, correlated with long-term complications (infertility, testicular neoplasia, and hormonal changes). Glycosamminoglycans are fundamental macromolecules of the extracellular matrix and they are involved in a wide range of physiological and pathological functions. The aim of this work is the biochemical analysis of glycosamminoglycans in normal and cryptorchid boar testes to highlight possible differences between normal and pathological tissue.

INTRODUZIONE
Il criptorchidismo, cioè la mancata discesa dei testicoli nello scroto, è considerata nell'uomo la patologia congenita più importante nello sviluppo, presente in più dell'1% dei bambini sotto i tre mesi di età, le cui maggiori conseguenze cliniche sono rappresentate da un elevato rischio d'infertilità e d'insorgenza di cancro testicolare nell'adulto. Esso può coinvolgere un solo testicolo (criptorchidismo monolaterale) o entrambi (criptorchidismo bilaterale). L'eziologia di tale patologia è idiopatica, multifattoriale e sembra in parte dovuta a uno squilibrio nel metabolismo degli ormoni steroidei e a un difetto dell'asse ipotalamo-ipofisario. Recenti studi hanno dimostrato che nella genesi del disturbo possono essere coinvolti fattori ambientali, come il contatto con sostanze chimiche (es. ftalati, pesticidi, detergenti) e lo stile di vita, oppure una predisposizione genetica. I glicosamminoglicani (GAGs) sono polisaccaridi lineari costituiti da un numero variabile di unità disaccaridiche ripetitive e rappresentano dei componenti fondamentali della matrice extracellulare e della superficie delle cellule animali. Essi, ad eccezione dell'acido ialuronico, possono presentarsi

covalentemente legati a un "core" proteico per formare proteoglicani. Ogni disaccaride risulta formato da una esosamina (D-galattosamina o D -glucosamina) e un acido uronico (D-glucuronato o o L-iduronato) o da un esoso neutro (D-galattoso) Tra i più importanti si ricordano l'acido ialuronico (HA), il condroitin solfato (CS), il dermatan solfato (DS), l'eparansolfato (HS), l'eparina e il cheratan solfato (KS). L'acido ialuronico è l'unico a non essere solforilato, viene sintetizzato da una sintasi a livello della membrana plasmatica e si ritrova non solo nel tessuto connettivo ma anche in tutti i tessuti e fluidi dell'organismo. I glicosamminoglicani sono coinvolti in una vasta gamma di funzioni biologiche, come la risposta immunitaria oppure la differenziazione, la proliferazione e la migrazione cellulare. Molti studi hanno inoltre evidenziato un ruolo fondamentale di queste molecole nella genesi di parecchi processi patologici, tra cui lo sviluppo tumorale. In questo lavoro ci è sembrato interessante isolare e caratterizzare dal punto di vista biochimico i glicosamminoglicani presenti nel testicolo sano e criptorchide di suino, dal momento che non vi sono dati disponibili in letteratura al riguardo, per evidenziare possibili differenze qualitative o quantitative tra un tessuto sano e un tessuto patologico che potrebbe potenzialmente dare luogo alla formazione di neoplasie.

MATERIALI E METODI

Per questo studio 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. Ciascun campione è stato suddiviso in due parti, una per l'esame istologico e l'altra per l'analisi biochimica. Per l'analisi istologica i tessuti normali e patologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 5 μm e colorati con ematossilina-eosina. Per i saggi biochimici i campioni sono stati omogeneizzati, digeriti con papaina e deproteneizzati con acido tricloroacetico. I glicosamminoglicani sono poi stati ottenuti per precipitazione mediante aggiunta di etanolo, seguita da liofilizzazione e solubilizzazione in acqua distillata. L'analisi quantitativa dei GAGs è stata ottenuta con il metodo colorimetrico di Bitter e Muir, utilizzando glucuronolattone come standard, ed espressa come μg di acido uronico/g di tessuto secco. I GAGs sono poi stati analizzati qualitativamente tramite elettroforesi su lastre di acetato di cellulosa secondo il metodo di Cappelletti et al. e colorate con Alcian blue 8GX, utilizzando come standard condroitin-6-solfato (CC), condroitin-4-solfato (CA), acido ialuronico (HA), eparan solfato (HS) e dermatan solfato (DS), (Sigma, St. Louis, MO, USA). Le bande elettroforetiche sono state analizzate con un densitometro (Apraise Junior Densitometer, Beckman Instruments) e le concentrazioni relative delle singole frazioni dei glicosamminoglicani sono state espresse in percentuale.

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 (Fig.1).

Per quanto riguarda l'analisi quantitativa effettuata col metodo colorimetrico, non abbiamo evidenziato in via preliminare sui nostri campioni alcuna differenza tra tessuto sano e patologico. Il saggio qualitativo effettuato mediante elettroforesi su acetato di cellulosa (Fig.2) seguito dall'analisi densitometrica (Fig. 3) invece sembra mettere in evidenza nel tessuto criptorchide un minor contenuto percentuale di acido ialuronico e una maggiore presenza di condroitin solfato A rispetto a quello sano .

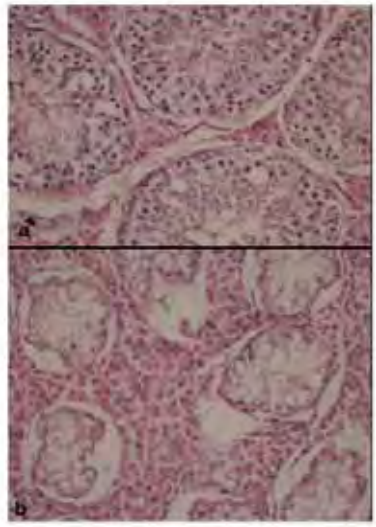


Fig. 1. a. Quadro istopatologico di un testicolo di suino sano: tubuli seminiferi contenenti l'intera linea seminale e scarse cellule di Leydig nell'interstizio. **b.** Testicolo criptorchide: tubuli seminiferi quasi vuoti rivestiti da un solo strato di spermatogoni intercalati a cellule del Sertoli, nell'interstizio notevolmente aumentate ed ipertrofiche le cellule del Leydig. Ematossilina-eosina 200x

Fig.1. a. Hystology of normal testis: seminiferous tubules containing the entire seminal line and few Leydig cells in the interstice. **b**. Cryptorchid testis: seminiferous tubules with empty spaces; spermatogonia with a degenerative pattern are placed in the basal compartment among the Sertoli cells. Interstitial Leydig cells are abundant and hypertrophic.H&E200x

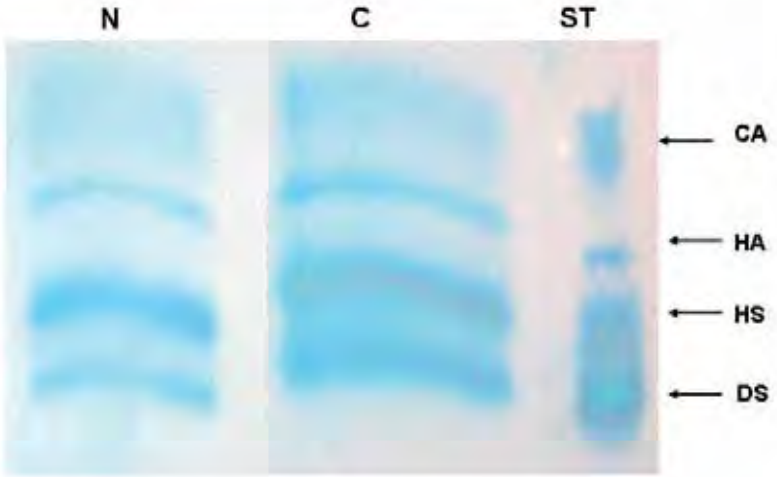


Fig 2. Elettroforesi dei glicosamminoglicani estratti da testicolo normale (N) e criptorchide (C) di suino.
ST: standard ; **DS**: dermatan solfato; **HS**: eparan solfato ; **HA**: acido ialuronico; **CA**: condroitin - 4 -solfato

Fig 2. Electrophoresis of glycosamminoglycans extracted from normal (N) and cryptorchid (C) boar testes.
ST: standard; **DS**: dermatan sulfate; **HS**: eparan sulfate ; **HA**:hyaluronic acid; **CA**: chondroitin 4 sulfate

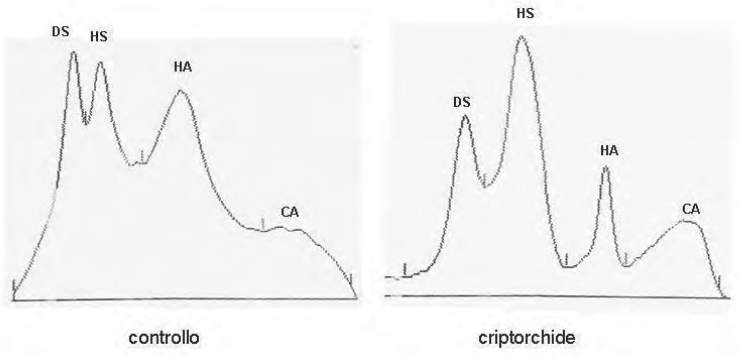


Fig.3. Analisi densitometrica dei glicosamminoglicani estratti dal testicolo sano e criptorchide di suino
Fig.3 .Densitometric analysis of glycosamminoglycans extracted from normal and cryptorchid boar testes

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La morfogenesi dei tessuti e degli organi richiede cambiamenti dinamici a livello di cellule e di componenti della matrice extracellulare, una sostanza gelatinosa che favorisce l'adesione cellulare e contiene canali per la diffusione di sostanze nutrienti e di ossigeno. E' noto dalla letteratura che molte molecole contenute nella matrice extracellulare sono di fondamentale importanza per la differenziazione e la crescita delle gonadi. Nel testicolo adulto la matrice extracellulare rappresenta un importante componente dell'interstizio e partecipa al trasporto di sostanze biologicamente attive necessarie per la comunicazione cellulare e per la regolazione della spermatogenesi e della sintesi ormonale. I proteoglicani e i glicosaminoglicani sono sostanze fondamentali per l'organogenesi e l'assemblaggio della matrice extracellulare e in particolare l'acido ialuronico (o ialuronano), pare sia di fondamentale importanza nel controllare la crescita cellulare e la differenziazione durante lo sviluppo embrionale. A causa della sua elevata polarità e idrofilicità, esso è capace di assorbire e trattenere saldamente grandi quantità d'acqua, espandendo lo spazio extracellulare e creando percorsi ottimali per la migrazione cellulare. Esso è in grado anche di prevenire il danneggiamento delle cellule e dei tessuti da stress fisici, agendo come molecola lubrificante. I livelli di questa sostanza sembrano diminuire con l'invecchiamento. Tra gli altri glicosamminoglicani anche il condroitin solfato ha una funzione lubrificante e conferisce elasticità e resistenza ai tessuti in cui si trova. Diversi studi dimostrano come in presenza di patologie tumorali i livelli di questa sostanza aumentano sensibilmente. Poiché il criptorchidismo rappresenta un problema notevole per quanto riguarda l'apparato genitale maschile nella specie umana e dal momento che il testicolo di suino sembra comparabile a quello dell'uomo per diversi aspetti, nel nostro lavoro abbiamo voluto indagare la presenza di eventuali differenze quali-quantitative riguardanti i glicosamminoglicani tra testicoli sani e testicoli criptorchidi di maiale, data l'importanza di queste molecole nella formazione e nel corretto funzionamento di questi organi. Mentre da un punto di vista quantitativo non abbiamo evidenziato differenze significative nel contenuto di glicosaminoglicani tra i due tipi di tessuto, qualitativamente invece abbiamo potuto riscontrare una diminuzione dei livelli di acido ialuronico e un aumento del condroitinsolfato A nel testicolo patologico rispetto a quello sano. La diminuzione dell'acido ialuronico nel testicolo criptorchide potrebbe essere dovuta al carattere "atrofico" del tessuto, non in grado di produrre spermatozoi maturi, mentre l'aumento del condroitin solfato A fa pensare a una possibile correlazione con la potenziale capacità del tessuto patologico di generare neoplasie. Alla luce di questi risultati quindi riteniamo utile approfondire il nostro studio utilizzando un numero maggiore di campioni.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, R.P. and D. N. R. Veeramachaneni (2007) "Cryptorchidism in common eutherian mammals". Reproduction 133,541–561.
- 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.
- Bitter T. and Muir HM (1962) "A modified uronic acid carbazole reaction". Analyt. Biochem. 4, 330-334.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1979a) "Rapid multisample separation of the five most widespread animal glycosaminoglycans". Analyt. Biochem. 93, 37-40.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1979b) "A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run" Analyt. Biochem. 99, 311-315.
- Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP (1980) "A new method for characterization on N-sulphate glycosaminoglycans by a rapid and multisample nitrous acid treatment during an electrophoretic run and its application to the analysis of biological samples" Analyt. Biochem. 105, 430-435.
- Iozzo RV (1998) "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function". Annu. Rev. Biochem. 67, 609-52.
- Iozzo RV (2005) "Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling" Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6 (8), 646-56.
- Ivell, R., and S. Hartung (2003) "The molecular basis of cryptorchidism". Mol. Hum. Reprod. 9, 175–181.
- Miqueloto C.A., Zorn T.M. (2007) "Characterization and distribution of hyaluronan and the proteoglycans decorin, biglycan and perlecan in the developing embryonic mouse gonad". J Anat. 211(1):16-25
- Mitropoulou TN and Stagiannis KD (2004) "Variation in sulfation pattern of galactosaminoglycan development of uterine leiomyoma". *Biomed. Chromatogr*. 18, 411-413.
- Mitropoulou TN, Theocharis AD, Stagiannis KD, Karamanos NK (2001) "Identification, quantification and fine structural characterization of glycosaminoglycans from uterine leiomyoma and normal myometrium". Biochimie. 83, 529-536.
- Pelliniemi LJ, Paranko J, Grund SK, Fröjdman K, Foidart JM, Lakkala-Paranko T (1984)" Extracellular matrix in testicular differentiation" Ann. N. Y. Acad. Sci. 438, 405-16.
- Poole AR (1986) "Proteoglycans in health and disease: structures and functions". Biochem. J. 236, 1-14.
- Theocharis AD, Tsara ME, Papageorgacopoulou N, Karavias DD, Theocharis DA (2000) "Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition". Biochim Biophys. Acta Oct 18;1502(2), 201-6
- Theocharis AD, Vynios DH., Papageorgakopoulou N, Skandalis SS, Theocharis DA (2003) "Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma". Inter. J. Biochem. Cell. Biol. 35**,** 376-390.
- Toole B. (1981) "Glycosaminoglycans in morphogenesis". In: Hay E, editor. Cell Biology of Extracellular Matrix. New York: Plenum Press pp. 259–289.
- Toole B. (2001) Hyaluronan in morphogenesis. Cell Dev Biol. 12,79–87.

RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE E CELLULO-MEDIATA DOPO VACCINAZIONE SINGOLA VERSO PCV2 IN SUINI SUCCESSIVAMENTE ESPOSTI AD INFEZIONE SPONTANEA

HUMORAL AND CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE IN PIGS VACCINATED WITH ONE DOSE OF A PCV2 VACCINE SUBSEQUENTLY EXPOSED TO NATURAL INFECTION

BORGHETTI P.[1], FERRARI L.[1], DE ANGELIS E.[1], MORGANTI M.[1], CALEFFI A.[2], GOZIO S.[3], GUAZZETTI S.[4], MARTELLI P.[1]

[1]Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma; [2]Medico Veterinario – Mantova; [3] Intervet/Shering-Plough Animal Health – Boxmeer – The Netherlands;[4] ASL – Reggio Emilia

Parole chiave: maiale, PCV2, vaccinazione, immunità umorale, immunità cellulo-mediata.

Key words: pig, PCV2, vaccination, humoral immunity, cell-mediated immunity

RIASSUNTO

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la capacità immunogena di un vaccino monodose verso PCV2 allestito con subunità esprimente la proteina Cap in un sistema baculovirus sia in termini di sviluppo della risposta immunitaria umorale (anticorpi totali) che cellulo-mediata (cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche) durante il periodo post-vaccinale e dopo esposizione a infezione naturale in confronto con animali non vaccinati. E' stata condotta una prova di campo in doppio-cieco, randomizzata e con gruppo di controllo su suinetti di un allevamento di 900 scrofe a ciclo chiuso con anamensi positiva per PMWS in soggetti di età superiore alle 15 settimane. Un totale di 411 suinetti è stato considerato per lo studio. All'inizio della prova (giorno dello svezzamento: 21±3 giorni di età), 205 suinetti (Gruppo vaccinato) hanno ricevuto una dose di vaccino Porcilis PCV® per via intramuscolare (2 ml). Lo stesso volume di adjuvante (Diluvac forte) è stato somministrato a 206 suinetti (gruppo placebo-controllo). A trenta suinetti selezionati casualmente (20 dal Gruppo controllo, 10 dal gruppo vaccinato) è stato effettuato un prelievo di sangue a partire da 3 settimane di età per sedici tempi successivi fino alla 35^ settimana (+32 settimane PV). Sui campioni di sangue sono state effettuate la determinazione degli anticorpi anti PCV2 mediante tecnica ELISA, degli anticorpi verso i principali patogeni responsabili di co-infezione (PRRSV e *Mycoplama hyopneumoniae*), e delle cellule secernenti IFN−γ PCV2 specifiche mediante tecnica ELISpot. A seguito della vaccinazione si osserva un rapido ed intenso incremento degli anticorpi anche nei soggetti con livelli medio alti di anticorpi di derivazione materna ($p < 0.01$); analogamente, la risposta immunitaria cellulare valutata come cellule secernenti IFN-γ PCV2 specifiche si incrementa in maniera consistente e statisticamente significativa. Dopo infezione alti livelli di anticorpi negli animali vaccinati sono associati a ridotta o assente viremia e mancanza di segni clinici. Per quanto riguarda la risposta immunitaria cellulo-mediata emerge che l'intensità della secrezione di IFN-γ appare dipendente principalmente dalla stimolazione *in vitro* (nel nostro caso PCV2 intero), dalla carica virale e dalle potenzialità di replicazione *in vivo*, nonché dal tipo di isolato.

SUMMARY

The present study was aimed at investigating the antibody response and the PCV2 IFN-γ secretion (by ELISpot) after vaccination and exposure to a natural infection, under field

conditions. A double-blinded, randomised and controlled field trial was conducted in a 900 farrow-to-finish sow herd with a history of PMWS in pigs older than 15 weeks. A total of 411 piglets were enrolled in the study. At inclusion (weaning - 21±3 days of age) 205 pigs (Group vaccinated) received a 2ml intramuscular dose of Porcilis PCV®. To act as controls, 206 pigs (Group control) were injected with 2mls of Diluvac Forte®. Thirty randomly selected piglets (20 controls and 10 vaccinated) were bled at 3 (inclusion /weaning /vaccination) and for 16 times until 35 weeks of age. The sera were tested with a blocking ELISA for the detection of PCV2-specific antibodies in porcine sera, and the titres expressed as $\log_2$. Moreover, ELISA tests were performed on sera for the detection of antibodies to PRRSV and M. hyo. The levels of IFN-γ secreting cells (SC) in the peripheral blood of pigs were also determined. After vaccination, there was a rapid and remarkable PCV2-specific IFN-γ secretion, as well as a significant increase in antibodies ($p< 0.01$). After infection high levels of antibodies in the vaccinated animals were associated with a reduced or absent PCV2 viremia, and a lack of specific clinical signs. Moreover, it could be proposed that the intensity of IFN-γ secretion depends mainly on the *in vitro* stimulation (in this case, whole PCV2), on viral load and replication *in vivo* as well as the characteristics of the isolate.

INTRODUZIONE

Sin dagli anni ’90 Circovirus tipo 2 del suino (PCV2) è considerato l’agente causale della Sindrome del Deperimento Multisistemico Post-svezzamento (PMWS), una delle principali patologie del suino (Allan et al., 1999). Oggigiorno PCV2 è stato associato ad altre patologie quali la sindrome dermatite-nefropatia del suino (PDNS), il complesso della patologia respiratoria del suino (PRDC), l’enterite e turbe riproduttive, complessivamente riferibile come patologie associate al’inezione da Circovirus del suino (PCVD) (Segalés et al., 2005). Indagini epidemiologiche hanno mostrato che il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), il virus dell’influenza suina (SIV), parvovirus suino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* sono i patogeni più comunemente coinvolti in questa sindrome in associazione tra loro e con PCV2 (Chae, 2004). Gli effetti del virus sul sistema immunitario del suino non sono stati ancora completamente delucidati. Lo sviluppo della PMWS è stata correlata ad uno stato di attivazione del sistema immunitario (Krakowka et al., 2001) oppure, è stato suggerito che l’infezione da PCV2 possa causare immunosoppressione (Darwing et al, 2004; Krakowka et al., 2002). Vari studi hanno riportato che l’infezione da PCV2 è in grado di indurre apoptosi delle cellule linfoidi portando così ad estensiva deplezione dei linfociti (Darwing et al, 2004).

Il controllo della PCVD si basa su strategie di gestione, controllo delle co-infezioni e sulla vaccinazione. Il primo vaccino commerciale per PCV2 reso disponibile, basato su virus inattivato con adiuvante, è stato registrato per l’utilizzo nei soli riproduttori (Reynaud et al.,2004). Ad oggi sono in uso tre vaccini commerciali per l’utilizzo in suinetti di 3-4 settimane o di maggior età. Due di questi vaccini si basano sulla proteina Cap expressa in un sistema a baculovirus (Fachinger et al., 2008; Fort et al, 2008), mentre un altro vaccino è costituito da virus chimerico contenente il genoma di un ceppo non patogeno di PCV1 in cui il gene per la proteina capsidica (ORF2-codificata) è stato sostituito con il corrispettivo di PCV2 (Fenaux et al, 2004). È stato dimostrato che l’induzione di una efficiente risposta immunitaria contro la proteina capsidica ORF2-codificata è il principale meccanismo di protezione (Blachard et al, 2003; Nawagitgul et al., 2000).

In condizioni di campo, tutti i vaccini commerciali per PCV2 sono stati in grado di ridurre la

mortalità e la percentuali di animali scarti nonché di migliorare significativamente l'incremento ponderale medio giornaliero (ADWG) in concomitanza alla riduzione della frequenza di co-infezioni negli allevamenti colpiti (Fachinger et al., 2008; King et al., 2008; Kixmoller et al., 2008; Horlen et al., 2008; Thacker et al., 2008; Desrosier et al., 2009). Inoltre, la vaccinazione verso PCV2 è in grado si ridurre l'intensità della viremia, la proporzione di animali infetti e le specifiche lesioni agli organi linfoidi virus-indotte. Al contrario, le conoscenze riguardanti il meccanismo mediante il quale si sviluppa la immunità protettiva sono ancora limitate e oggetto di studio (Fachinger et al., 2008; Fort et al., 2008; Horlen et al., 2008). Alcuni studi dimostrano l'importanza di risposte immuntarie sostenute sia da anticorpali totali e virus-neutralizzanti sia dalla componente cellulo-mediata (Fort et al., 2008; Kixmoller et al., 2008; Fort et al., 2009; Opriessnig et al., 2008a, 2008b).
La maggior parte delle ricerche pubblicate hanno caratterizzato la risposta immunitaria umorale a seguito di infezione da PCV2 sulla base della rilevazione di anticorpi totali anti-PCV2, mostrando la sieroconversione sia in animali infetti subclinici (non-PMWS) che in animali infetti con PMWS conclamata (Rodriguez-Arrioja et al., 2002; Larochelle et al., 2003; Sibila et al., 2004; Grau-Roma et al., 2009). Al contrario, il ruolo, i meccanismi e i parametri di efficienza della risposta immunitaria cellulo-mediata in relazione al controllo dell'infezione da PCV2 e alle patologie ad essa associate non hanno ricevuto ancora una adeguata indagine, soprattutto in condizioni di campo. Da alcuni studi sperimentali è emerso che l'immunità cellulo-mediata valutata come numero di cellule secernenti (SC) IFN-γ PCV2-specifiche potrebbero essere responsabili della eliminazione virale parallelamente al ruolo agli anticorpi con attività virus-neutralizzante (Fort et al., 2009a, 2009b). Al contrario, tali aspetti sono ancora da indagare in condizioni di campo sia in animali vaccinati che non vaccinati, naturalmente infettati da PCV2, anche in corso di co-infezioni.
Lo scopo del presente studio è quello di valutare la capacità immunogenica di un vaccino monodose verso PCV2 allestito con subunità esprimente la proteina Cap in un sistema baculovirus sia in termini di sviluppo della risposta immunitaria umorale (anticorpi totali) che cellulo-mediata (cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche) dopo vaccinazione e dopo esposizione a infezione naturale in confronto con animali non vaccinati.

MATERIALI E METODI

Animali. E' stata condotta una prova di campo in doppio-cieco, randomizzata e con gruppo di controllo su suinetti di un allevamento di 900 scrofe a ciclo chiuso con anamensi positiva per manifestazioni cliniche e relativa mortalità da PMWS in soggetti di età superiore alle 15 settimane. Un totale di 411 suinetti (maschi e femmine) è stato considerato per lo studio. All'inizio della prova (giorno dello svezzamento: 21±3 giorni di età), 205 suinetti (Gruppo vaccinato) hanno ricevuto una sola dose di vaccino Porcilis PCV® per via intramuscolare (2 ml). Lo stesso volume di adjuvante (Diluvac forte) è stato somministrato a 206 suinetti (gruppo placebo-controllo).
A trenta suinetti selezionati casualmente (20 controlli, 10 vaccinati) è stato effettuato un prelievo di sangue a 3 (selezione), 4 (1 settimana post-vaccinazione, PV), 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 26 e 35 settimane di età (+32 settimane PV).

Determinazione dei titoli degli anticorpi anti-PCV2. I titoli degli anticorpi anti-PCV2 nel siero sono stati determinati mediante blocking ELISA. In breve, i pozzetti delle piastre sono stati rivestiti O/N a 2-8°C con antigene di PCV2 da ORF2 (proteina Cap) espresso in baculovirus. Dopo opportuni lavaggi si è proceduto al blocco dei siti aspecifici e sono state aggiunte diluizioni seriali dei sieri da testare. Un campione di siero standard, un campione di siero positivo ed uno negativo sono stati analizzati un parallelo in ciascuna piastra. Dopo opportuni lavaggi è stato aggiunto anticorpo monoclonale biotinilato PCV2-specifico. La

reazione è stata evidenziata con metodo avidina coniugata con perossidasi (APO, DAKO A/S, Danimarca) con TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) come cromogeno. I dati sono stati elaborati ed i titoli anticorpali sono stati calcolati mediante programma Multi-calc con un valore di cut-off impostato al 50% di bloccaggio. Il valore di cut-off di estinzione è stato calcolato a partire dal campione di siero standard positivo e negativo ed i titoli sono stati espressi come $\log_2$.

Rilevazione dei titoli anticorpali verso patogeni responsabili di co-infezione. La presenza di anticorpi anti-PRRS e i valori S/P sono stati determinati mediante kit ELISA commerciale (HerdChek* Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kit - IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) secondo le istruzioni del produttore. Gli anticorpi per *M. hyopneumoniae* sono stati valutati mediante kit ELISA commerciali (Herd Check Mycoplasma - IDEXX Laboratories). I risultati sono stati valutati sulla base dei valori di S/P definiti come: (OD campione – OD controllo negativo) / (OD controllo positivo – OD controllo negativo). Valori di S/P ≥0.4 sono considerati come positivi.

Determinazione delle cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche. I livelli di cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche nel sangue periferico sono stati determinati secondo Martelli *et al*. (2009). In breve, le PBMC sono state isolate mediante gradiente di densità in Histopaque-1.077® e seminate alla densità di 2 x 10^5 cellule/pozzetto in RPMI-1640 addizionato con 10% FBS (RPMI-1640) in piastre a 96 pozzetti (MultiScreen®$_{HTS}$-IP MSIPS4510 - Millipore) rivestite O/N a 4°C con 10 μg/ml di anticorpo anti-IFN-γ (P2G10 - BD) e bloccate con RPMI-1640 per 2 ore a 37°C. Per la ri-stimolazione *ex vivo* è stata aggiunta una sospensione virale di PCV2 (isolato I12/11 – Boxmeer, The Netherlands) in RPMI-1640 per 20 ore a 37°C, 5% CO_2; la risposta lineare è stata testata tra 0.05 e 0.25 MOI. In tutti i campioni la vitalità delle PBMC è stata >98% (Trypan blu). Le piastre sono state quindi incubate per 1 ora a 37°C con 0.5 μg/ml di anticorpo anti-IFN-γ biotinilato (P2C11 - BD) e successivamente con anticorpo anti-biotina coniugato con perossidasi in PBS/0.5% BSA. Si è effettuata infine una incubazione con BCIP/NBT (BioRad) e la reazione è stata bloccata con acqua distillata. La frequenza di cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche è stata determinata mediante lettore ELISpot AID®. Come controllo negativo, 2 x 10^5 PBMC/pozzetto sono state incubate in assenza di stimolo. I valori di base delle cellule non stimolate sono stati sottratti ai rispettivi valori nelle cellule stimolate e la risposta cellulo-mediata è stata espressa come numero di cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche per milione di PBMC (IFN-γ SC/10^6 PBMC).

Analisi statistica. E' stato applicato un modello di regressione logistica ad effetto misto al fine di considerare la non-indipendenza delle misure ripetute sugli stessi soggetti e l'effetto della scrofa (effetto di nidiata). Nel modello, queste due variabili sono state trattate come "effetti casuali", mentre l'effetto dell'allevamento (due livelli), il sesso, il tempo e il trattamento e le loro interazioni sono state considerate come "effetti fissi". Il modello ha anche tenuto in considerazione la auto-correlazione degli errori per uno stesso suinetto, con un termine auto-regressivo. L'analisi è stata effettuata mediante "lme4" (Bates, D. M., & Sarkar, D. (2007). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes, R package version 0.999375-32).

RISULTATI

La somministrazione del vaccino verso PCV2 ha indotto un aumento di anticorpi specifici con un incremento di circa tre volte superiore rispetto ai titoli iniziali dopo tre settimane dalla vaccinazione ($p< 0.01$). Gli animali con i più alti livelli di anticorpi materni (MDA) al momento della vaccinazione hanno manifestato sieroconversione anche se di entità inferiore

rispetto ai soggetti con livelli anticorpali materni più bassi. Negli animali di controllo gli anticorpi acquisiti passivamente sono gradualmente diminuiti e non sono più rilevabili a 9-12 settimane di età.
A tre settimane post-vaccinazione, il numero di cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche ha mostrato un valore massimo di 120 IFN-γSC/10^6 PBMC nei soggetti vaccinati, mentre nei controlli tale risposta si è mantenuta a livelli prossimi a zero. A seguito dell'avvenuta infezione a 15-16 settimane di età (dati non mostrati), i livelli anticorpali sono oggetto di un significativo incremento e tali si mantengono sino alla fine dello studio (35 settimane di età) (Figura 1).

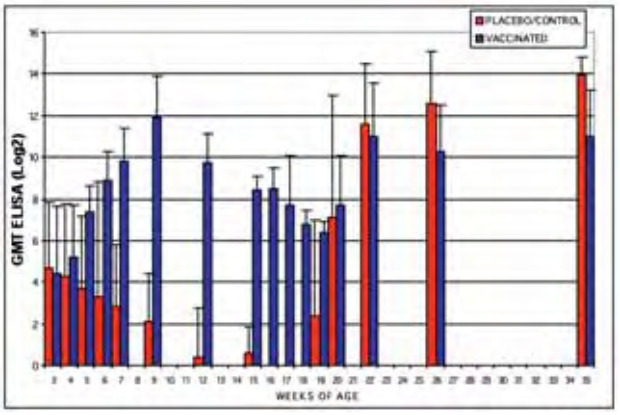


Fig. 1: Andamento dei titoli anticorpali ELISA anti-PCV2 nei suini vaccinati e nei suini di controllo.
Figure 1: Course of geometric mean of the ELISA titres in vaccinated and placebo/control pigs.

Per quanto attiene alle cellule secernenti IFN-γ contestualmente all'incremento dei titoli anticorpali si evidenzia un loro significativo aumento ($p< 0.01$) nel solo gruppo di controllo con valori massimi tra 19 e 20 settimane di età (196 – 244 IFN-γ SC) e il mantenimento di elevati livelli (140 IFN-γ SC) almeno sino a 26 settimane di età.

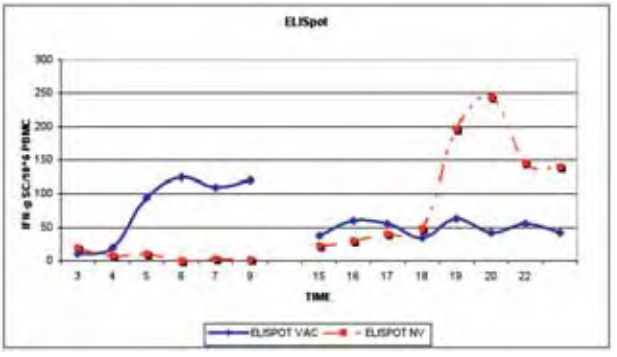


Fig. 2: Andamento del numero di cellule secernenti IFN-γ dopo vaccinazione e infezione. I livelli sono espressi come cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche su 10^6 PBMC (IFN-γ SC/ 10^6 PBMC).
Figure 2: Course of the number of IFN-g SC/10^6 PBMC after vaccination and after infection.

Al contrario, l'infezione negli animali vaccinati e clinicamente protetti mostra un andamento variabile nel tempo con un transitorio aumento della risposta IFN-γ-mediata alla 19^ settimana mentre nelle settimane successive si è mantenuto pressoché costante con valori oscillanti tra 40 e 60 IFN-γ SC.
Per quanto attiene alle sieroprevalenze delle infezioni concomitanti di maggior rilievo (figura 3) si deve segnalare che l'infezione da PRRSV avviene già prima della nona settimana di età,

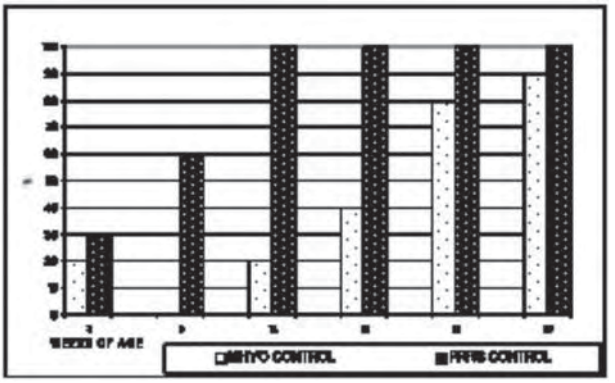


Fig. 3: Andamento delle sieroprevalenze verso M.hyo, PRRSV e PCV2.

Figure 3: Course of the seroprevalence to M. hyo, PRRSV and PCV2 infections.

tanto che a 12 settimane la prevalenza di infezione appare del 100%. Analogamente, titoli rilevabili verso *Mycoplasma hyopneumoniae* si evidenziano a 12 settimane con andamenti ad incrementare nei tempi successivi, testimoniando della diffusione graduale dell'infezione stessa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo studio di campo mettono in evidenza che le infezioni da PRRSV e M.hyo precedono ampiamente quella da PCV2 in quanto si realizzano già durante la fase post-svezzamento in soggetti di età inferiore o prossima alle 9 settimane. In particolare, a 12 settimane di età il 100% degli animali risulta sieropositivo verso PRRSV come effetto dell'avvenuta infezione. La cinetica degli anticorpi verso M. hyo, stante la sieroprevalenza del 20% circa osservata a 12 settimane con tendenza ad incrementare quasi linearmente nel tempo, autorizza a ritenere che questa infezione diffonda contestualmente a quella da PCV2. Poichè l'infezione da M.hyo inizia più precocemente rispetto a quella da PCV2 ed è caratterizzata da lenta diffusibilità, la maggior parte della popolazione si trova a subire la co-infezione di entrambi questi patogeni con una cinetica sovrapponibile.
Nelle condizioni del presente studio si può ritenere che la comparsa tardiva della malattia associata a PCV2 (16-18 settimane di età degli animali) e la relativa mortalità, veda comunque l'intervento di co-infezioni ad insorgenza più precoce o contemporanea che, nel caso di PRRSV, caratterizza tutto il periodo di osservazione.
Nel presente lavoro è stata analizzata la risposta immunitaria umorale, tramite la determinazione degli anticorpi totali misurati mediante la tecnica ELISA e la risposta immunitaria cellulo-mediata mediante la determinazione del numero di cellule secernenti IFN-γ PCV2 specifiche tramite le tecnica ELISpot. A tale proposito si sottolinea che i valori di anticorpi ottenuti con la tecnica ELISA sono del tutto assimilabili con i titoli IPMA (dati non mostrati).
Dopo la vaccinazione, effettuata a 3 settimane di età, i risultati ottenuti evidenziano che il

vaccino induce la produzione di anticorpi e che, contestualmente, è registrabile un'intensa risposta IFN-γ-mediata PCV2-specifica.
Nei soggetti controllo, non vaccinati e sottoposti a trattamento placebo con il solo adiuvante, il declino degli anticorpi passivi colostrali (MDA) avviene in maniera costante e pressochè lineare nel tempo, cosicché tra la 9^ e la 12^ settimana di età detti anticorpi non sono più rilevabili. Analogamente a quanto riferito da Fort et al. (2008) il vaccino, con una singola somministrazione, si è dimostrato in grado di indurre una precoce e marcata sieroconversione già due-tre settimane dopo l'intervento, superando la possibile interferenza degli anticorpi di derivazione materna. Inoltre, i soggetti con titolo ELISA maggiori di 8 $\log_2$ al momento della vaccinazione, che nel caso in discussione rappresentano circa il 10% della popolazione campionata, non manifestano né una sieroconversione post-vaccinale né un marcato declino anticorpale come evidenziabile invece nei soggetti non vaccinati mostranti gli stessi titoli iniziali. In questi soggetti, infatti, i titoli ELISA si mantegono pressochè costanti. Si deve comuque sottolineare che, in accordo con quanto riportato da Fort et al. (2008), anche i soggetti vaccinati che non mostrano sieroconversione, risultano protetti nei confronti dell'infezione (riduzione della viremia) e delle manifestazioni cliniche e dell'eventuale *exitus*.
A seguito dell'infezione, la presenza di anticorpi negli animali vaccinati si accompagna ad assenza di manifestazioni cliniche riferibili alla malattia associata a PCV2 (PCVD) nonché a percentuali ridotte di soggetti viremici, nei quali le quantità di copie di genoma virale/ml di siero risultano costantemente inferiori a 10^6 (dati non mostrati). Al contrario, nei soggetti di controllo, accanto alla comparsa di manifestazioni cliniche specifiche e della mortalità correlata, l'infezione induce la comparsa di anticorpi che tendono ad incrementare per raggiungere valori massimi entro la terza settimana post-infezione. Successivamente al raggiungimento dei valori massimi i livelli anticorpali in entrambi i gruppi si mantengono costantemente elevati sino alla fine dello studio.
Le conoscenze sulla risposta immunitaria cellulare nei confronti dell'infezione da PCV2 sono ancora oggetto di approfondimento in quanto quelle attualmente disponibili si riferiscono a valutazioni effettuate in condizioni di infezione sperimentale.
In questo studio è descritto lo sviluppo della risposta IFN-γ SC sia nel periodo post-vaccinazione che durante il realizzarsi di infezione spontanea con induzione della relativa malattia. Tale valutazione è stata condotta in quanto lo studio dell'infezioni da PCV2 in condizioni sperimentali differisce da ciò che si realizza in condizioni di esposizione naturale, a motivo degli effetti conseguenti alle ben note e frequentemente registrate co-infezioni. Si deve rammentare che negli studi di laboratorio la mancata comparsa delle manifestazioni cliniche specifiche nei soggetti infettati sperimentalmente rappresenta una condizione particolare che non ricalca quanto si realizza in campo per effetto sia delle infezioni multiple che della presenza di co-fattori intrinseci ed estrinseci di esacerbazione della malattia. Inoltre, è stato evidenziato che in condizioni sperimentali, l'efficienza dell'immunità cellulare può variare significativamente in relazione ai carichi virali differenti utilizzati come inoculo ed alle caratteristiche del virus, dal momento che si ritiene possano esservi variazioni di patogenicità tra isolati diversi, nonché all'utilizzo di virus pieno o antigeni purificati nella metodica di laboratorio ELISpot utilizzata (Fort et al. 2008; 2009).
Dopo la somministrazione di una singola dose di vaccino si osserva l'attivazione di una risposta cellulare che si incrementa in maniera consistente fin dalla seconda settimana, mantenendosi elevata nel tempo. Nello stesso periodo il numero di IFN-γ SC nei soggetti di controllo risulta collocarsi su valori basali, prossimi allo zero.
Durante la fase di esposizione/infezione naturale, la risposta delle cellule secernenti IFN-γ PCV2 specifiche mostra un andamento nettamente differente tra animali vaccinati e animali non vaccinati. Da 15 a 18 settimane di età, in entrambi i gruppi, tale risposta si mantiene a valori relativamente bassi comunque superiori negli animali vaccinati come residuo dell'attivazione primaria vaccinale. Viceversa, tra la diciottesima e la diciannovesima

settimana di età si assiste a sieroconversione in entrambi i gruppi e, negli animali controllo non vaccinati, i valori delle cellule secernenti IFN-γ PCV2-specifiche subiscono un rapido e notevole incremento con mantenimento di valori elevati anche nelle successive settimane di osservazione. Nell'ultimo periodo tali elevati valori di IFN-γ SC PCV2 specifiche si associano ad una riduzione della percentuale di animali virologicamente positivi.
Quest'ultimo riscontro, in animali non vaccinati, infetti e con manifestazioni cliniche o subcliniche riconducibili a PCVD può essere comparabile, seppur con le dovute differenze in termini di "timing" e di gravità dell'infezione, con quanto osservato da Fort et al. (2009) in cui lo sviluppo della risposta IFN-γ-SC nei soggetti infetti anche con malattia subclinica comincia ad essere misurabile nella maggior parte degli animali tra 14 e 21 giorni post-infezione, in coincidenza con il calo del carico virale nel sangue. Tali Autori concludono che la risposta cellulare può contribuire alla clearance virale in associazione con lo sviluppo della risposta umorale PCV2 specifica.
Inoltre, i dati ottenuti negli animali non vaccinati clinici trovano concordanza con un altro lavoro di Fort et al, (2009) in cui si osserva che l'intensità della risposta cellulo-mediata può differire in relazione allo stimolo utilizzato *in vitro*. Infatti, negli animali vaccinati, infettati e non, le risposte alla proteina Cap sono similari o leggermente più alte rispetto a quando viene utilizzato il virus pieno come stimolo. Al contrario gli stessi Autori trovano che negli animali non vaccinati e infettati la risposta IFN-γ-SC ottenuta dopo stimolazione con virus "pieno" è più elevata rispetto a quella ottenuta con la proteina Cap. Queste evidenze suggeriscono che gli animali infetti, in cui il virus si sta replicando, possano rispondere intensamente anche ad altri componenti antigenici del virus.
Anche nel nostro studio in campo, l'elevata risposta IFN-γ SC PCV2 specifica negli animali clinici e con elevati livelli di carico virale, sono da riportare al tipo di re-stimolazione effettuata sui PBMC *in vitro* con virus pieno. Si può ritenere che la produzione di IFN−γ nei PBMC indotta da tale tipo di stimolo, coinvolgendo l'attivazione linfocitaria sia verso proteine antigeniche di tipo strutturale (Cap protein) ma soprattutto verso proteine legate alla replicazione virale (Rep protein), possa essere fortemente incrementata in animali in cui il virus sta replicando in maniera importante *in vivo*. Non è da escludere che la coinfezione in questi animali possa rappresentare un ulteriore cofattore di "iperattivazione" di tale risposta.
Viceversa, si può ragionevolmente ritenere che, negli animali vaccinati in cui vi è assenza di malattia e basso/assente livello di infezione e conseguente viremia, la re-stimolazione *in vitro* dei PBMC con virus PCV2 pieno, evidenzi solo una risposta variabile in un numero di per sé limitato di cellule linfocitarie riattivabili.
Si può quindi ipotizzare che l'intensità della risposta da cellule secernenti IFN-γ potrebbe dipendere fortemente dal tipo di stimolazione *in vitro* (nel caso specifico, struttura intera di PCV2) e dalla carica e replicazione virale nell'animale *in vivo*. Non è da escludere che tale parametro possa essere influenzato anche dal tipo di isolato. Appare pertanto auspicabile che ulteriori approfondimenti sulla risposta immunitaria cellulo-mediata durante l'infezione naturale tramite l'utilizzo anche di altri parametri (espressione *in vivo* di citochine e fenotipizzazione delle cellule linfocitarie IFN-γ secernenti) possano meglio delucidare i meccanismi che si associano al ruolo protettivo dell'immunità cellulo-mediata ed alle differenti evoluzioni cliniche della malattia da PCV2.
I risultati delle prova di campo, oggetto del presente lavoro, dimostrano che la somministrazione di una singola dose del vaccino utilizzato induce sieroconversione anche nei soggetti con livelli di anticorpi di derivazione materna (MDA). Nei soggetti con livelli elevati di MDA al momento della vaccinazione, che nel nostro caso e con la metodica sierologica utilizzato possono essere riferiti a titoli superiori a 8 log2, pur non realizzandosi sieroconversione il declino dell'immunità passiva si realizza più lentamente, facendo comunque in modo

che anche 15 settimane dopo la vaccinazione il grado di protezione conferito dal vaccino sia ottimale nel prevenire la viremia,le manifestazioni cliniche e le lesioni specifiche. Analogamente, si è dimostrato che anche la risposta immunitaria cellulo-mediata PCV2 specifica viene adeguatamente e prontamente indotta dalla singola vaccinazione intervenendo poi anche sui meccanismi di risposta durante l'infezione naturale.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.M., F. Mc Neilly, B.M. Meehan, S. Kennedy, D.P. Mackie and J.A. Ellis *et al*., Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland, *Vet Microbiol* **66** (2) (1999), pp. 115–123. Bates, D. M., & Sarkar, D. (2007). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes, R package version 0.999375-32.
2. Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflec'h, M.A. Baudouard and P. Cordioli *et al*., Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins, *Vaccine* **21** (31) (2003), pp. 4565–4575.
3. Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnaud, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec & A. Jesten. An ORF2 protein based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* **94** (2003), pp. 183-194.
4. Chae C., Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology, *Vet J* **168** (1) (2004), pp. 41–49.
5. Darwich L., J. Segalés and E. Mateu, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle, *Arch Virol* **149** (2004), pp. 857–874.
6. Desrosiers, R., Clark, E., Tremblay, D., Tremblay, R., & Polson, D. (2009). Use of a one-dose subunit vaccine to prevent losses associated with porcine circovirus type 2. *Journal of Swine Health and Production, 17*(3), 148-154.
7. Fachinger V., R. Bischoff, S.B. Jedidia, A. Saalmuller and K. Elbers, The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex, *Vaccine* **26** (2008), pp. 1488–1499.
8. Fenaux M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger and X.J. Meng, 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* **78** (12) (2004), pp. 6297–6303.
9. Fort M., M. Sibila, A. Allepuz, E. Mateu, F. Roerink and J. Segales, Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins, *Vaccine* **26** (2008), pp. 1063–1071.
10. Fort M., M. Sibila, E. Pérez-Martín, M. Nofrarías, E. Mateu and J. Segalés, One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model, *Vaccine* **27** (2009), pp. 4031–4037.
11. Fort, M., Fernandes, L. T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., et al. (2009). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 129*(1-2), 101-107.
12. Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enoe, C., Casal, J., Botner, A., Nofrarías, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J. & Larsen, L. E. 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol* 135, 272-82.

13. Horlen K.P., S.S. Dritz, J.C. Nietfeld, S.C. Henry, R.A. Hesse and R. Oberst *et al*., A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2, *J Am Vet Med Assoc* **232** (2008), pp. 906–912.
14. King D., P. DuBois, T. Painter, T. Holck, R. Edler and C. Johnson *et al*., Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination, *Proceedings of the AASV Congress* (2008), pp. 159–162.
15. Kixmoller M., M. Ritzmann, M. Eddicks, A. Saalmuller, K. Elbers and V. Fachinger, Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2, *Vaccine* **26** (2008), pp. 3443–3451
16. Krakowka S., J.A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D.M. Rings and G. Allan, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2), *Vet Pathol* **38** (1) (2001), pp. 31–42.
17. Krakowka, J.A. Ellis, F. McNeilly, D. Gilpin, B. Meehan and K. McCullough *et al*., Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection, *Viral Immunol* **15** (4) (2002), pp. 567–582.
18. Larochelle R., R. Magar and S. D'Allaire, Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome, *Can J Vet Res* **67** (2) (2003), pp. 114–120.
19. Martelli P., Gozio S, Ferrari L, Rosina S, De Angelis E, Quintavalla C, Bottarelli E, Borghetti P (2009). Efficacy of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. Vaccine, vol. 27; p. 3788-3799
20. Nawagitgul P., I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden and P.S. Paul, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, *J Gen Virol* **81** (Part 9) (2000), pp. 2281–2287.
21. Opriessnig T., A.R. Patterson, D.M. Madson, N. Pal and P.G. Halbur, Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination, *Vaccine* **27** (2009), pp. 1002–1007.
22. Opriessnig T., A.R. Patterson, J. Elsener, X.J. Meng and P.G. Halbur, Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2, *Clin Vaccine Immunol* **15** (2008), pp. 397–401.
23. Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D. M., Patterson, A. R., Pal, N., Carman, S., et al. (2008). Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *Journal of General Virology, 89*(10), 2482-2491.
24. Reynaud G., A. Brun, C. Charreyre, S. Desgouilles and P. Jeannin, Safety of a repeated overdose of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional pregnant filts and sows, *Proceedings of the 18th Congress International Pig Veterinary Society* (2004).
25. Rodriguez-Arrioja G.M., J. Segales, M. Calsamiglia, A.R. Resendes, M. Balasch and J. Plana-Duran *et al*., Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *Am J Vet Res* **63** (3) (2002), pp. 354–357
26. Segalés J., G.M. Allan and M. Domingo, Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev* **6** (2) (2005), pp. 119–142.
27. Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A. & Domingo, M. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 65, 88-92.
28. Thacker B., Wilson W., Francisco C, Schuleter R. (2008) Circumvent PCV vaccine: performance evaluation and serological studies update. In: Proceedings of the AASV pag. 153-156.

MONITORAGGIO SIEROLOGICO, VIROLOGICO E PRODUTTIVO PER IL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA PRRSV IN UN ALLEVAMENTO DA RIPRODUZIONE ENDEMICAMENTE INFETTO

SEROLOGICAL, VIROLOGICAL AND PRODUCTIVE MONITORING TO CONTROL PRRSV INFECTION IN AN ENDEMICALLY INFECTED BREEDING HERD

BORTOLETTO G.[1], MARTINI M.[1], NARDELLI S.[2], DRIGO M.[1]

[1]Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD);
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Parole chiave: PRRSV, monitoraggio, acclimatamento, sequenziamento, stabilità aziendale.
Key words: PRRSV, monitoring, acclimatization, sequencing, herd stability.

Riassunto. Obiettivo di questo studio é stato il monitoraggio della situazione epidemiologica relativa a PRRSV in un allevamento da riproduzione endemicamente infetto che basa il controllo dell'infezione sull'acclimatamento delle scrofette da rimonta in associazione ad alti standard di biosicurezza. Da aprile 2007 a marzo 2009, 24 gruppi consecutivi di scrofette sono stati testati al momento della loro entrata in produzione per verificare il loro status sierologico e virologico. Ulteriori 5 monitoraggi trasversali sono stati effettuati regolarmente per monitorare la circolazione del virus nei settori produttivi coinvolti nell'acclimatamento e la stabilità della popolazione virale. In seguito ad un focolaio di 27 aborti nel periodo ottobre-novembre 2008, è stato possibile dimostrare l'entrata di un nuovo ceppo virale attraverso il confronto della sequenza di ORF7 con quelle ottenute in precedenza. L'analisi di alcuni tra i più importanti parametri produttivi ha confermato ovviamente il calo delle performance produttive al momento del focolaio, ma anche che in un sistema di acclimatamento ben gestito il ritorno alla stabilità aziendale può essere conseguito rapidamente.

Summary. The aim of this study was to monitor the epidemiologic situation of PRRSV in an endemically infected breeding herd which controls the infection through the replacement gilts acclimatization associated with a high biosecurity policy. From April 2007 to March 2009, 24 consecutive groups of gilts were tested when introduced into the breeding unit to verify their serological and virological status. Furthermore, five transversal monitorings were carried out regularly to investigate the viral circulation in the productive units of the herd involved in the acclimatization program and to analyze the virus stability over time. After an outbreak of 27 abortions in the period October-November 2008, it was possible to demonstrate the entry of a new viral strain comparing its ORF7 sequence with previous sequences obtained in the same herd. The analysis of the most relevant production parameters confirmed the breakdown of the productive performance during the outbreak, but it demonstrated that in a well managed acclimatization system the return to herd stability can be achieved rapidly.

INTRODUZIONE

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è considerata da tempo uno dei maggiori problemi che affliggono la suinicoltura mondiale. In Italia la situazione

epidemiologica dell'infezione è caratterizzata da un'elevata diffusione del virus in quasi la totalità degli allevamenti, anche se spesso in assenza di sintomatologia rilevabile (Cordioli 2003) e dalla circolazione di ceppi profondamente diversi tra loro (Pesente et al. 2006). In particolare, negli allevamenti da riproduzione l'infezione endemica da PRRSV è resa possibile dal fatto che sono sempre presenti animali in diversi stadi di infezione ed immunità. In tale situazione, il primo passo per limitare la circolazione virale è dato dall'utilizzo di riproduttori che siano stati esposti all'infezione ed abbiano sviluppato un'efficace risposta immunitaria prima di entrare in produzione. Appare quindi chiaro come la rimonta delle scrofette rappresenti la chiave principale per controllare la PRRS (Batista et al. 2004): un costante acclimatamento dei riproduttori determina infatti la stabilizzazione dei segni clinici, il miglioramento dei parametri riproduttivi e la produzione di suini non viremici allo svezzamento (Zimmerman et al. 2006).
Data la grande variabilità genetica ed antigenica dei virus di campo (Batista et al. 2004), risulta inoltre indispensabile l'adozione di rigide misure di biosicurezza atte ad evitare l'entrata di PRRSV in un allevamento negativo o di nuovi stipiti virali in aziende già infette. Pertanto, in assenza di strumenti di profilassi indiretta efficaci in tutte le realtà di campo, soltanto la stretta cooperazione tra allevatori, veterinari e laboratoristi (Dee e Joo 1997) ed il regolare monitoraggio sierologico degli animali per studiare l'evoluzione dell'infezione nelle aziende (Le Potier et al. 1997) permettono di conseguire un valido controllo della PRRS.
In questo studio è stato monitorato con regolarità e per un lungo periodo di tempo lo stato sierologico, virologico e produttivo di un allevamento da riproduzione, con particolare attenzione allo status delle scrofette a fine acclimatamento. Nei campioni risultati positivi a RT-PCR si è inoltre proceduto al sequenziamento dell'ORF7, ossia il segmento genomico più conservato all'interno dei diversi stipiti virali (Meulenberg et al. 1997, Pesente et al. 2006) e codificante per la proteina più immunogena di PRRSV (proteina N).
Il monitoraggio costante della situazione aziendale e l'analisi filogenetica delle sequenze ottenute hanno permesso di dimostrare l'effettiva endemicità dell'infezione da PRRSV nell'allevamento in presenza di un unico ceppo virale e di valutare l'entità della rottura dell'equilibrio clinico ed epidemiologico instauratosi nel tempo dovuta all'entrata di un virus molto diverso da quello circolante in azienda.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un'azienda suinicola da riproduzione di 1550 scrofe a banda settimanale situata in Veneto, i cui suinetti vengono venduti a 30-35 kg. L'azienda è infetta da PRRS dal 1995, con due gravi focolai abortivi nel 1995 e nel 2003. La rimonta dei riproduttori è esterna ed è effettuata acquistando ogni mese 52 scrofette di 3 settimane d'età ed un peso di 6 kg da un centro genetico PRRS-free certificato. Vista la scelta di non usare strumenti di profilassi indiretta nei confronti di PRRSV, negli anni è stata messa a punto una strategia di acclimatamento che prevede un periodo sufficientemente lungo di esposizione delle scrofette allo stipite virale circolante in azienda attraverso il contatto diretto e costante con suinetti nati in azienda. L'obiettivo è quello di fecondare delle scrofette di circa 8 mesi di vita, dotate di una buona copertura anticorpale ma non più viremiche.
Per testare l'efficacia del programma di acclimatamento sono stati campionati 24 gruppi consecutivi di scrofette al momento della loro entrata in produzione, nel periodo tra aprile 2007 e marzo 2009, per un totale di 1185 animali. All'interno del periodo di studio sono stati effettuati anche 5 monitoraggi trasversali dell'allevamento con cadenza stagionale, attraverso il prelievo di sangue in suinetti dalla 2ª alla 13ª settimana di vita, per un totale

di 607 animali testati.
Tra ottobre e novembre 2008 si è verificato un focolaio di aborti in scrofe a fine gestazione, dai cui feti è stato possibile prelevare delle aliquote di liquido polmonare.
Tutti i campioni di siero e le aliquote di liquido polmonare sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA virale e a Real-Time RT-PCR di screening su pool di 5 campioni ciascuno. I campioni singoli dei pool positivi sono stati poi analizzati tramite RT-PCR e, quelli risultati positivi, purificati e sequenziati con modalità descritte da Pesente et al. nel 2006.
I campioni di siero delle scrofette sono stati sottoposti anche a metodica ELISA per la ricerca di anticorpi, seguendo le istruzioni fornite dal produttore.
I dati produttivi sono stati ricavati interrogando il programma informatico aziendale.

ANALISI STATISTICA DEI DATI
I dati espressi come frequenza (percentuale di messa in parto, percentuale di fertilità e numero di aborti, riferito al totale delle gravidanze) sono stati analizzati mediante il test del χ^2. Dopo aver verificato la normalità dei parametri (numero di parti, numero di suinetti svezzati, numero di svezzati/scrofa/anno, numero di nati totali/figliata, numero di nati vivi/figliata, numero di svezzati/figliata) mediante il test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov, è stato impiegato il test T per un campione al fine di confrontare i valori produttivi ottenuti nel trimestre ottobre-dicembre 2008 contro quelli ottenuti complessivamente nei rimanenti trimestri. Un valore di $P<0,05$ è stato considerato come soglia di significatività statistica. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS per Windows, Rel. 12.0.0.2003 (SPSS Inc., Chicago – IL).

ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE
Le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche sono state allineate utilizzando il programma ClustalW incluso nel software Mega4 (Kumar et al. 2008) con cui sono stati analizzati anche gli alberi filogenetici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

SCROFETTE A FINE ACCLIMATAMENTO
I valori di prevalenza delle scrofette sieropositive a fine acclimatamento seguono sostanzialmente lo stesso andamento dei valori di s/p espressi come media del gruppo (Fig. 1). Nella fase iniziale dello studio la strategia di acclimatamento non si è dimostrata particolarmente efficace, con risultati sierologici scarsi sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, soprattutto nei gruppi di luglio e di novembre 2007. Nei mesi successivi la situazione si è gradualmente stabilizzata ed ha permesso di raggiungere e spesso superare la soglia dell'80% di scrofette coperte immunologicamente all'entrata in produzione. Questo miglioramento è imputabile principalmente alla maggior attenzione prestata dagli allevatori nel ricambio dei suinetti adibiti ad untori e alla maggiore circolazione virale, che nei mesi più freddi è facilitata dalle basse temperature e dall'alta umidità (Albina 1997).
L'effetto della stagionalità si può facilmente notare anche confrontando i risultati virologici delle scrofette, con il 100% di pool positivi ottenuti da 3 dei 24 gruppi analizzati e viremie di minor entità ma comunque presenti in altri 6 gruppi, in concomitanza soprattutto dei mesi invernali. Per ovviare al rischio di trasmissione virale a scrofe gravide prive di anticorpi specifici, le scrofette vengono mantenute separate dal resto del branco scrofe nei reparti di fecondazione e gestazione e fatte partorire in sale parto diverse da quelle delle scrofe pluripare.

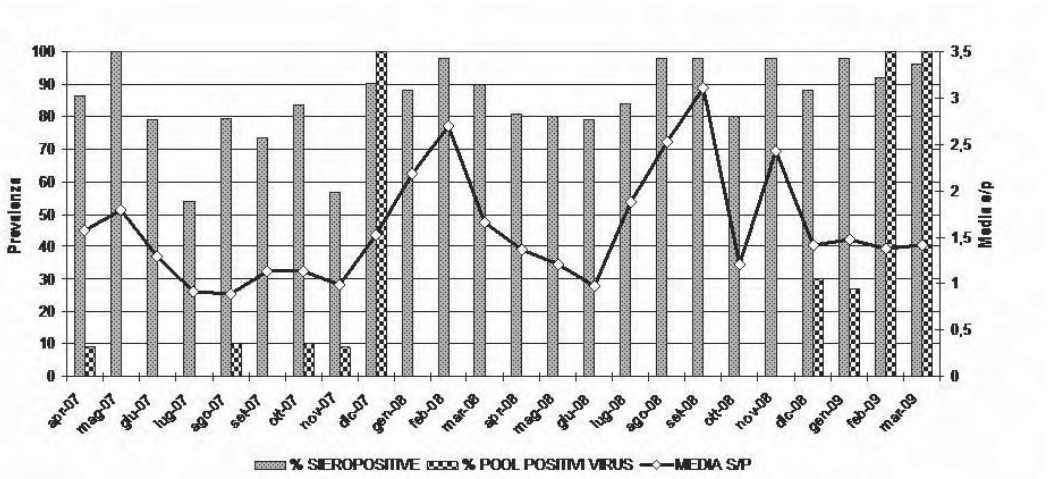


Fig. 1 Dati sierologici e virologici dei 24 gruppi di scrofette a fine acclimatamento
Fig. 1 *Serological and virological data of the 24 groups of gilts at the end of acclimatization*

MONITORAGGI VIROLOGICI TRASVERSALI
Una grande variabilità è stata osservata anche nella prevalenza di pool positivi per PRRSV ottenuti dai 5 monitoraggi trasversali (Tab. 1), con valori che vanno da un minimo di 13% del luglio 2008 ad un massimo di 100% del febbraio del 2009. Infatti, l'endemizzazione dell'infezione in azienda e il conseguente aumento dell'immunità di popolazione tendono a far diminuire la circolazione virale, confinandola in ristrette zone dell'allevamento. Se da una parte questo risulta positivo, tenendo lontano il virus dai reparti produttivi più critici, dall'altra comporta che nel tempo l'infezione naturale avvenga in maniera più difficoltosa anche nei settori interessati alla strategia di acclimatamento.

Tab. 1 Risultati dei 5 monitoraggi traversali in allevamento
Tab. 1 *Results of the 5 herd cross monitorings*

Data	*Numero animali*	*Pool*	*Positivi*	*Negativi*	**% positivi**
30/10/2007	200	40	38	2	**95**
07/05/2008	115	23	17	6	**74**
29/07/2008	77	16	2	14	**13**
08/10/2008	100	20	16	4	**80**
17/02/2009	115	23	23	0	**100**
TOTALE	607	122	96	26	**79**

PARAMETRI PRODUTTIVI

I dati produttivi aziendali relativi ai due anni di studio sono stati suddivisi in 10 trimestri per meglio apprezzare l'evoluzione delle performance dell'allevamento nel tempo. Si è deciso di estendere il periodo analizzato fino a settembre 2009 per poter valutare in maniera più accurata l'andamento della situazione aziendale dopo un focolaio di PRRS verificatosi tra fine ottobre ed inizio novembre 2008.

Come evidenziato in Tabella 2, il trimestre ottobre-dicembre 2008 è caratterizzato da un aumento significativo del numero di aborti rispetto agli altri 9 periodi analizzati (χ^2=87,61; gdl=9; p<0,0000) e da un calo altrettanto significativo di diversi parametri produttivi: numero di parti (t=11,885; p<0,001), percentuale di messa in parto (χ^2=91,45; gdl=9; p<0,0000), numero di suinetti svezzati (t=9,399; p<0,001), numero di svezzati/scrofa/anno (t=7,730; p<0,001), numero di nati totali per figliata (t=6,671; p<0,001), numero di nati vivi per figliata (t=6,311; p<0,001) e numero di svezzati per figliata (t=5,035; p<0,01). La percentuale di fertilità ottenuta nel trimestre ottobre-dicembre 2008 è l'unico tra i parametri analizzati che è aumentato rispetto a quelli mediamente conseguiti negli altri trimestri. In particolare spicca il valore del 77,9% del trimestre luglio-settembre 2009 che rende il confronto particolarmente significativo dal punto di vista statistico (χ^2=157,30; gdl=9; p<0,0000). Contrariamente a quanto riportato in altre esperienze di campo (Bonilauri et al. 2006) PRRSV non sembra quindi aver interessato i primi momenti della gestazione.

Il confronto tra le medie per gli stessi parametri produttivi nel periodo antecedente il focolaio (aprile 2007–settembre 2008) con quelle nel periodo che lo hanno seguito (gennaio–settembre 2009) non hanno dimostrato differenze statisticamente significative , anche se numero di parti, numero di svezzati e numero di nati vivi per figliata tendono alla significatività. Questo dimostra che l'evento infettivo ha causato dei danni evidenti solo in un periodo relativamente limitato di tempo e che la situazione aziendale è tornata alla normalità già nei primi mesi a seguire, con performance che si avvicinano a quelle pre-focolaio.

Periodo	Numero parti	% messa in parto	Numero aborti	% fertilità	Numero svezzati	Svezzati/ scrofa/ anno	Nati tot/ figliata	Nati vivi/ figliata	Svezzati/ figliata
Apr-Giu '07	962	83,7	7	86,6	10758	27,53	11,96	11,74	11,26
Lug-Set '07	958	87,3	2	86,7	10560	27,30	11,76	11,45	10,69
Ott-Dic '07	925	84,1	0	91,1	9302	23,96	11,08	10,86	10,19
Gen-Mar '08	980	91,2	5	92,8	10470	26,76	11,61	11,31	10,75
Apr-Giu '08	963	91,8	3	87,3	10720	27,42	11,96	11,65	11,05
Lug-Set '08	961	88,9	3	84,1	10516	27,88	11,69	11,48	10,94
Ott-Dic '08	**822**	**80,8**	**27**	**89,8**	**8269**	**22,46**	**10,85**	**10,55**	**10,10**
Gen-Mar '09	877	88,3	7	87,7	9308	25,24	11,15	10,87	10,51
Apr-Giu '09	926	87,4	4	85,1	9854	25,46	11,52	11,10	10,66
Lug-Set '09	951	85,9	5	77,9	9688	24,47	11,35	10,92	10,23

Tab. 2 Analisi delle performance produttive

Tab. 2 *Analysis of production performance*

ANALISI FILOGENETICA

Complessivamente è stato possibile ottenere 44 sequenze complete di ORF7 di 387 basi. L'analisi filogenetica tramite l'algoritmo neighbor-joining è rappresentata in Figura 2 e rivela la presenza in allevamento di una popolazione virale stabile costituita da un solo ceppo di PRRSV con una p-distance di 1,4% di basi in 2 anni. La sequenza ottenuta dal liquido polmonare dei feti abortiti nel focolaio di ottobre–novembre 2008, chiamata 02 301008 e segnalata da una freccia, è risultata invece profondamente diversa da quelle del ceppo circolante in azienda: la p-distance nucleotidica è di 9,4-10,8% e quella aminoacidica di 10,2-13,4%, con mutazioni concentrate all'inizio ed alla fine del segmento genomico. Poiché questo virus non era mai stato ritrovato prima di allora, la sua comparsa è presumibilmente associata ad una rottura della biosicurezza aziendale (Bonilauri et al. 2006). Il fatto che esso non sia più stato rinvenuto nei monitoraggi successivi al focolaio sembra confermare il ritorno alla stabilità aziendale.

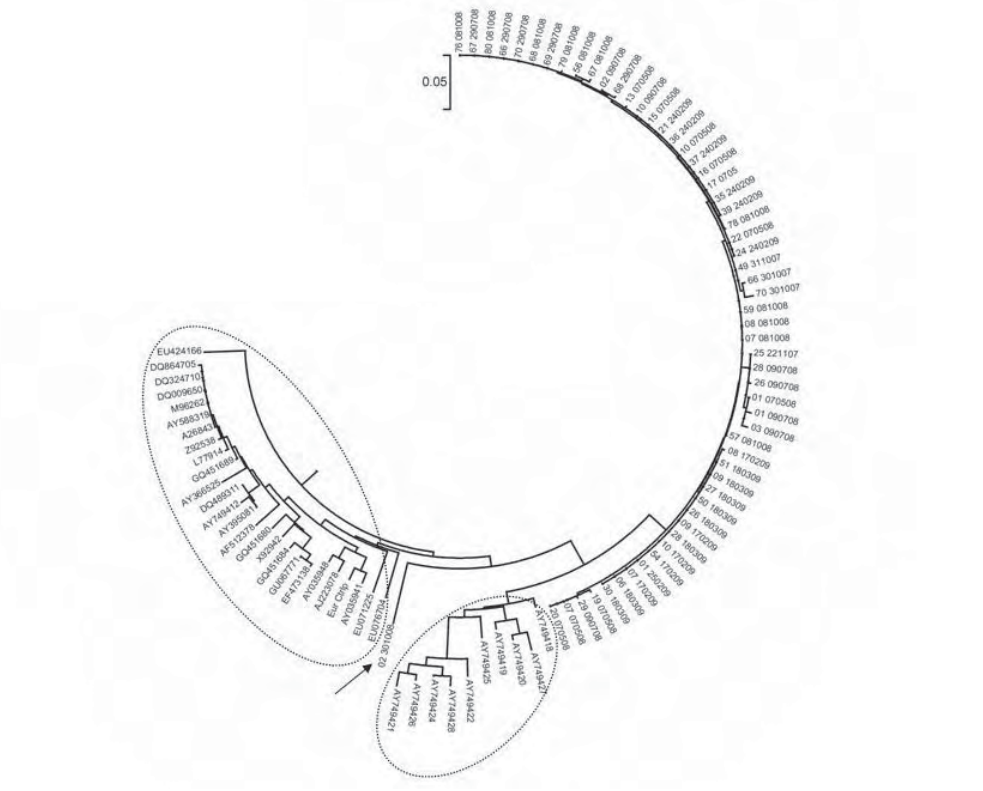


Fig. 2 Albero filogenetico delle sequenze complete di ORF7 dei ceppi virali dell'azienda oggetto di questo studio e di altre sequenze di ORF7 depositate in GenBank (racchiuse negli ovali). Le sequenze ottenute in questo studio sono state rappresentate da un numero a due cifre indicante il numero di campione e da un numero a sei cifre indicante la data di campionamento.

Fig. 2 *Phylogenetic tree of the complete ORF7 sequences of the PRRSV strains of the herd of this study and of other ORF7 sequences deposited in GenBank (contained in the ovals). Sequences obtained in this study were represented by a two-digit number indicating the number of sample and a six-digit number indicating the sampling time.*

CONCLUSIONI

Nel 1998 S. A. Dee definiva la stabilità di un allevamento da riproduzione infetto da PRRS come l'assenza di circolazione virale in verri, scrofe e scrofette, affermazione questa comunemente accettata e condivisa. Tuttavia, in una situazione di infezione endemica come quella che caratterizza la maggior parte degli allevamenti italiani, si può certamente completare il concetto di stabilità aziendale facendo riferimento all'assenza di segni clinici imputabili all'infezione in scrofe e suinetti e al rilevamento di una popolazione virale d'allevamento costante ed immutata nel tempo. É evidente come la stabilità aziendale sia un equilibrio estremamente fragile e dinamico, da salvaguardare e garantire attraverso l'adozione di rigide misure di biosicurezza e di strategie di controllo mirate. Questo è particolarmente vero se si considera che la grande variabilità genica degli stipiti virali diffusi in campo e la scarsa cross-protezione immunitaria da essi prodotta impediscono la completa efficacia degli strumenti vaccinali finora in nostro possesso.
Come sostenuto da Pesente et al. nel 2006 e ampiamente dimostrato in questo lavoro, l'acclimatamento delle scrofette da rimonta rappresenta un valido mezzo per assicurare l'instaurarsi di una buona immunità specifica prima della loro entrata in produzione. Vista però la complessa ecologia del virus ed il dinamismo della sua circolazione dovuta alla stagionalità e alla variabilità dell'immunità di popolazione, anche le migliori strategie di acclimatamento necessitano di essere regolarmente monitorate analizzando dati sierologici, virologici e clinici dell'allevamento. Tale monitoraggio può essere effettuato attraverso controlli periodici sia delle scrofette a fine acclimatamento, sia dei suini stabulati nei reparti svezzamento e magronaggio. Ciò risulta utile per valutare regolarmente la situazione epidemiologica aziendale, monitorare l'omologia spazio-temporale dei virus circolanti e verificare l'effettiva circolazione virale nei settori meno critici.
Anche sistemi ben collaudati come quello dell'allevamento oggetto di questo studio possono incorrere in qualche rottura. In questo caso, nonostante la presenza di una buona copertura anticorpale verso PRRSV, l'ingresso di un nuovo virus dall'esterno ha potuto alterare la stabilità aziendale con la comparsa di episodi abortivi e di un forte calo delle performance riproduttive degli animali, analogamente a quanto descritto da Bonilauri nel 2006. La presenza però di una buona biosicurezza interna, costituita principalmente da un pig-flow metodico e dalla preparazione del personale aziendale, ha consentito di ristabilire l'equilibrio originario dell'azienda anche in breve tempo.
Si può quindi concludere che l'acclimatamento delle scrofette, la biosicurezza esterna ed i sistemi di biosicurezza interna concorrano sinergicamente al mantenimento della stabilità aziendale, ciascuno rimediando alle possibili *dèfaillance* a carico di uno dei tre fattori. A nostro avviso, il monitoraggio costante degli allevamenti e l'analisi filogenetica degli stipiti di campo sono strumenti ancora troppo confinati nell'ambito della ricerca e poco applicati nella pratica. Essi invece devono essere visti come un'importante se non fondamentale ausilio per comprendere le cause delle alterazioni dell'equilibrio aziendale e per fornire agli allevatori soluzioni sempre più specifiche e strumenti di controllo sempre più validi. Per questo motivo, in accordo con l'allevatore dell'azienda oggetto di questo studio, si è deciso di continuare a monitorare anche in futuro la situazione dell'allevamento con monitoraggi traversali regolari, prestando particolare attenzione agli aborti a fine gestazione. Inoltre, il completamento dell'analisi filogenetica delle sequenze finora ottenute attraverso il sequenziamento del segmento genomico ORF5 permetterà un'analisi più accurata dei ceppi circolanti, al fine di stabilire la loro distanza dal ceppo vaccinale europeo e di verificarne l'evoluzione a livello genomico nel tempo.

CLOSTRIDIOSI IN SALA PARTO: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO DALL'INSORGENZA ATIPICA

CLOSTRIDIOSIS IN THE FARROWING ROOM: A CLINICAL CASE REPORT WITH AN ATYPICAL ONSET

RAFFI V.[1], MAZZONI C.[1], ROSIGNOLI C.[2], BONILAURI P.[2], SPAGGIARI B.,[2] GELMETTI D.[2], GIBELLI L.[2], MAIOLI G.[2], FACCINI S.[2], DOTTORI M.[2], LUPPI A[2], TONON F[1].

[1] *Libero professionista;*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.*

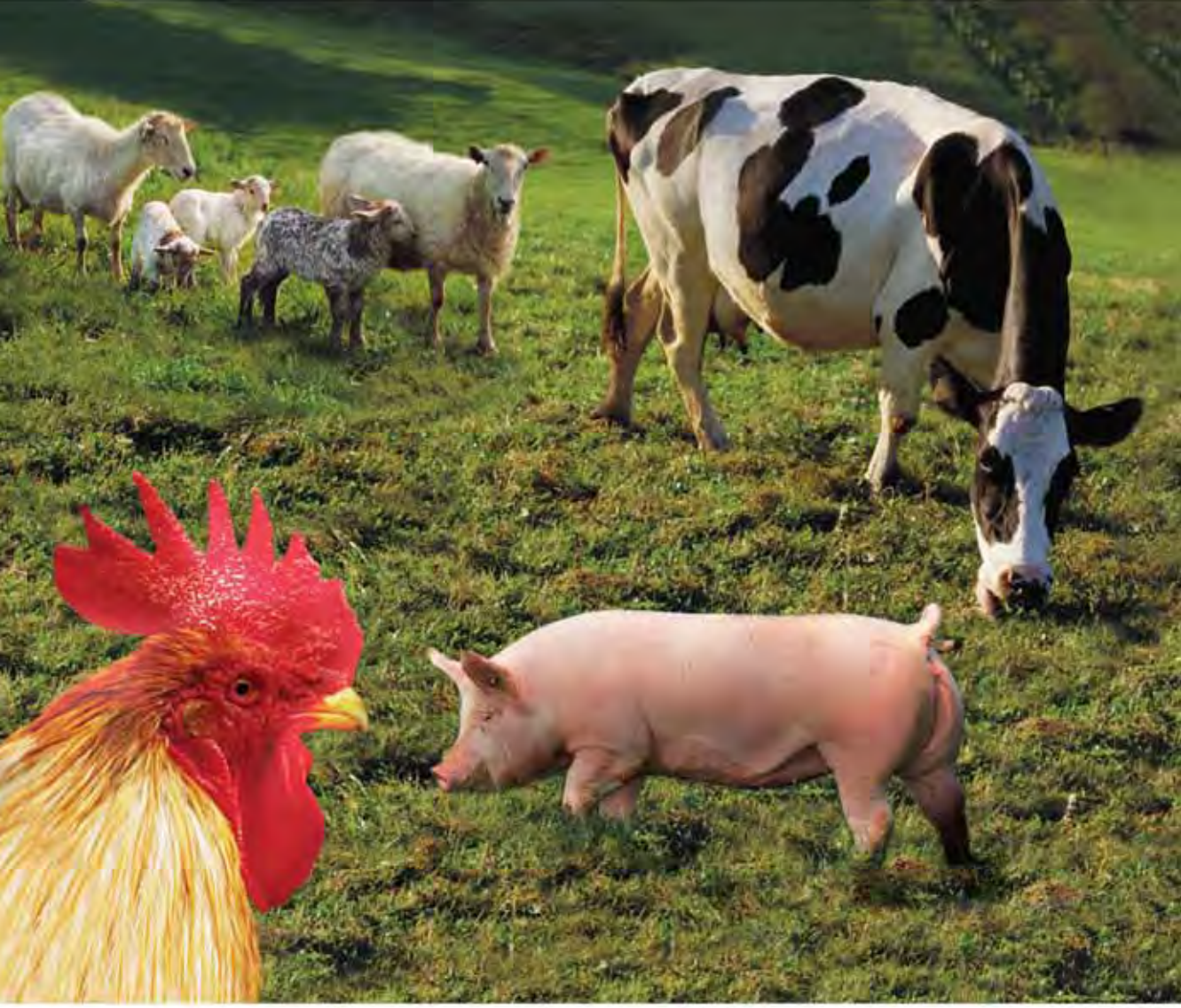
Parole chiave: *Clostridium perfringens*, suinetti, diarrea emorragica
Keywords: *Clostridium perfringens*, piglets, haemorrhagic diarrhea

RIASSUNTO. Nel presente lavoro gli Autori riportano la comparsa di una sindrome caratterizzata da morte entro dodici ore dall'insorgenza dei sintomi, in numerose nidiate di suinetti lattanti di circa un giorno di vita in un allevamento suino del Nord Italia. I sintomi clinici erano caratterizzati da ittero, apatia e diarrea e l'esame necroscopico, eseguito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER), sezione di Reggio Emilia, evidenziava quadri degenerativi epatici con necrosi parenchimali ed un'enterite necrotico-emorragica al piccolo intestino. Sono state condotte indagini tossicologiche sul mangime somministrato alle scrofe per la ricerca di micotossine con esito negativo. *Clostridium perfrigens* è stato isolato dal piccolo intestino (1 x 10^7 ufc di *C. perfrigens* per ogni grammo di contenuto intestinale) di diversi suinetti sottoposti ad esame necroscopico. La successiva genotipizzazione tramite multiplex PCR, eseguita presso la sezione di Mantova dell'IZSLER, ha identificato l'agente eziologico come portatore dei geni codificanti per le tossine α e $\beta 2$. L'esame istologico ha evidenziato quadri di degenerazione epatica torbido-vacuolare, di enterite necrotica al piccolo intestino e la presenza di numerose colonie di batteri gram-positivi sporigeni nel lume intestinale. La soluzione del problema è stata ottenuta attraverso il trattamento terapeutico con un macrolide long acting in tutti i suinetti nelle prime dodici ore dopo la nascita.

ABSTRACT. In this work the Authors described a syndrome in several suckling piglet broods (one-day old) occurred in a herd in the Northern Italy and characterised by death 12 hours after the onset of clinical signs. Clinical signs were characterised by jaundice, lethargy and diarrhea. Dead animals submitted for necropsy to IZSLER, Reggio Emilia Laboratory, showed good nutritional condition, necrosis of small intestine mucosa and liver degeneration with foci of parenchymal necrosis. Sow feed micotoxin toxicological investigations were carried out to elucidate the nature of liver degeneration with negative results. *Clostridium perfrigens* was isolated from the small intestine of several piglets (1 x 10^7 ufc of *C. perfrigens* from each gram of intestinal content). In Mantova laboratory (IZSLER) genes for toxins α and $\beta 2$ were detected using a multiplex polymerase chain reaction method from *C. perfrigens* isolated. Histological examination of samples collected during the necropsy showed vacuolar liver degeneration, necrotic enteritis and multiple gram-positive, spore-forming bacterial colonies in the lumen. The syndrome did not appear to be related to dietary or any other specific management factors. A long acting macrolid administer to piglets in the first twelve hours after the birth let a complete solution of the syndrome.

BIBLIOGRAFIA

Albina E. (1997) "Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview". Vet. Microbiol. 55, 309-316.
Batista L., Pijoan C., Dee S.A., Olin M., Molitor T.W., Joo H.S., Xiao Z., Murtaugh M.P. (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.
Batista L., Pijoan C., Lwamba H., Johnson C.R., Murtaugh M.P. (2004) "Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico". J. Swine Health Prod. 12, 170-175.
Bonilauri P., Mazzoni C., Merialdi G., Fallacara F., Barbieri I., Dottori M. (2006) "Uso del sequenziamento del ORF7 del virus della PRRS, un esempio pratico". Atti del XXXII meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Modena 23-24 marzo 2006, 239-248.
Cordioli P. (2003) "PRRS, una sindrome da conoscere a fondo". Rivista di suinicoltura 5, 59-60.
Dee S.A. (1998) "A protocol for defining breeding herd stability and classifying farms according to PRRS status to identify potential intervention strategies: A summary of 200 farms". Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998, 262.
Dee S.A., Joo H.S. (1997) "Strategies to control PRRS: A summery of field and research experiences". Vet. Microbiol. 55, 347-353.
Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. (2008) "MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences". Bioinformatics 9, 299-306.
Le Potier M.F., Blanquefort P., Morvan E., Albina E. (1997) "Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French "Pays de la Loire" region". Vet. Microbiol. 55, 355-360.
Meulenberg J.J.M., Petersen den Besten A., de Kluyver E., van Nieuwstadt A., Wensvoort G., Moormann R.J.M. (1997) "Molecular characterization of Lelystad virus". Vet. Microbiol. 55, 197-202.
Pesente P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Sperati Ruffoni L., Torriani S. (2006) "Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management". Vet. Microbiol. 114, 214-224.
Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M. (2006) "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)" in: Straw B., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of swine", 9a ed., Blackwell Publishing, 387-417.



La soluzione giusta per ogni **specie** di problema

www.vetclub.it

Bayer HealthCare
Animal Health

NUMEROVERDE
800-015121

SEGNALAZIONE DI UN CASO DI POLIMELIA IN UN SUINETTO

POLIMELYA IN A PIG: CASE REPORT

BOTTA E.[1], DIMARCOBERARDINO F.[2], MASSA M.[1], MIHOC M.[2], RIGANO R.[1], RUSSO FRATTASI M.[2]

1.Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN), Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino, 2. Medico Veterinario Libero Professionista.

Parole chiave: suino, malformazione congenita, polimelia, esame radiografico.

Keywords: pig, congenital malformation, polymelia, radiographic exam.

RIASSUNTO

I difetti congeniti negli animali da reddito e in quelli d'affezione sono relativamente frequenti. In questo lavoro segnaliamo una caso di malformazione nel suino. Un suinetto presentava dalla nascita due arti ectopici soprannumerari in regione pelvica (polimelia). Il trattamento di una simile anomalia non ha alcuna utilità pratica, tuttavia, il tipo curioso di malformazione molto evidente (4 arti posteriori), il buono stato di salute ed il normale sviluppo del suinetto ci hanno stimolati ad una indagine radiografica e bibliografica.

ABSTRACT

Congenital defects in work animals and pets are relatively frequent. In this study we would like to discuss a malformation in swine. A piglet was born with two ectopic supernumerary limbs in pelvic region (polymelia). The treatment of a similar abnormality has been of no practical use, nonetheless, the peculiar and highly evident type of malformation (4 hind limbs), its good health condition and a normal development of the piglet motivated us to carry out a radiographic and bibliographic study.

INTRODUZIONE

Le malformazioni congenite sono relativamente frequenti nei suini, specialmente se comparate alla frequenza con cui tali anomalie si manifestano nelle altre specie domestiche. Difetti congeniti come le ernie ombelicali, le ernie inguinali, l'atresia del retto sono abbastanza tipici dei suini. Le malformazioni congenite degli arti sono numerose e vengono indicate usando come prefisso il difetto specifico e come suffisso melia (mélos = arto) o dattilia (dactilos = dito) a seconda che il difetto coinvolga un intero arto o un dito. Anatomicamente, le malformazioni degli arti sono classificate secondo diverse caratteristiche:

- ectromelia (ektrosis = errore), meromelia (méros = parte), assenza di parte di un arto
- ectromelia totale o amelia (a = mancanza), se l'agenesia colpisce tutto l'arto
- focomelia, quando l'ipoplasia o l'aplasia colpisce i segmenti prossimali dell'arto
- emimelia (hēmi = mezzo), la modificazione dell'architettura ossea colpisce la metà di uno o più segmenti di un arto
- micromelia, l'arto presenta tutte le sue componenti, ma di dimensioni ridotte rispetto alla norma
- bimelia, completo o parziale raddoppiamento di un arto
- polidattilia, presenza di una o più dita soprannumerarie.

Gli arti possono essere rinvenuti in localizzazioni anomale, come avviene nella cephalomelia (cranio), epigastromelia (zona epigastrica), notomelia (notos = dorso), perineomelia (perineo) o nella polimelia dove l'arto o gli arti ectopici sono attaccati alla zona pelvica.

Difetti e disordini congeniti degli arti sono molto comuni nei suini, ma la polidattilia è molto rara (Mulley and Edwards, 1984). Casi di arti ectopici sono stati descritti in bovini (Schönfelder *et al*., 2003), negli ovini (Hiraga e Dennis, 1993), nelle capre (Ramadan *et al.,* 1998), nei polli (Hoffman, 1968) e nell'uomo (Rivera *et al*.,1999), tuttavia sono estremamente rari nei suini. E' stato descritto un unico caso di polimelia nel suino (Hamori, 1983). In genere, gli arti accessori sono sempre più piccoli di quelli normali, con pochi muscoli, rigidità delle articolazioni e assenza di innervazione (Pohlmeyer, 1974).

DESCRIZIONE DEL CASO

Descriviamo il caso di un suinetto ibrido, femmina, svezzato a 27 giorni, in buono stato di salute, senza segni clinici e con performances normali. Il suinetto presentava due arti accessori in regione pelvica (Fig. 1, 2), che non ostacolavano la deambulazione e la normale vita di relazione. Il suinetto è stato sottoposto ad anestesia generale: premedicazione con azaperone (Stresnil) ed anestesia con tiletamina (Zoletil 100) per poter eseguire delle lastre radiografiche. Gli arti ectopici originavano dalla regione pelvica uniti fino all'altezza del ginocchio dove si dividevano, il sinistro, ruotato caudalmente e il destro cranialmente. Le dimensioni degli arti ectopici erano simili a quella degli arti normali. In posizione quadrupedale, la colonna vertebrale caudalmente tendeva verso destra e la groppa era asimmetrica, più bassa a destra Il suinetto camminava normalmente, anche la corsa non era disturbata dalla presenza degli arti ectopici soprannumerari.

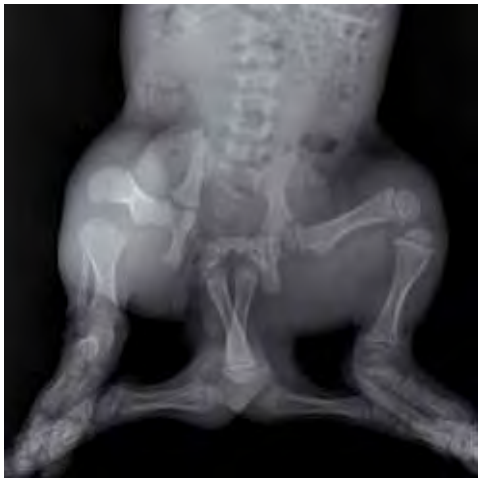
(Fig. 1, 2 : Suinetto in anestesia generale che presenta due arti ectopici in regione pelvica).
(Pict. 1, 2: Piglets under general anesthesia which has two ectopic limbs in the pelvic region).

Sono state fatte due radiografie con un apparecchio radiografico portatile Isomedic 100/30, con sviluppo digitale Kodak, una in proiezione dorso - ventrale e l'altra in proiezione latero – laterale (Fig.3, 4).
Proiezione dorso - ventrale 72 Kvolt / 1.8 mAs:

- Lo sviluppo della struttura ossea e la densità dello scheletro sono normali. Bacino: il sacro è deviato verso destra con concavità a sinistra, come le vertebre coccigee. Diastasi patologica della giunzione sacro iliaca destra. Ischio mancata saldatura dei nuclei di ossificazione a destra con netta separazione tra i due segmenti. I femori accessori si articolano (pseudo articolazione) medialmente sull'ischio. Gli arti, sia quelli normali che quelli accessori, sono normosviluppati e sovrapponibili come struttura e non ci sono difetti nello sviluppo osseo.

Proiezione latero - laterale 72 Kvolt / 1.8 mAs

- Sviluppo completo di tutti i segmenti ossei di tutti gli arti. I capi articolari del ginocchio destro normale presentano una distanza anomala.



(Fig. 3, 4 E' possibile notare la normale e completa conformazione degli arti accessori che si vanno ad articolare medialmente sugli ischii.)
(Pict. 3, 4: You can see the normal and complete limb conformation to be articulate medially on Ischia.)

DISCUSSIONE

Le malformazioni congenite sono delle anomalie del normale sviluppo di un organo o di un apparato presenti dalla nascita, possono essere legate a fattori genetici (endogeni) e all'azione di agenti teratogeni (esogeni).
I fattori genetici che provocano malformazioni sono trasmissibili secondo le leggi dell'ereditarietà o correlati ad alterazioni cromosomiche che possono essere sia di tipo numerico che strutturale.
I fattori teratogeni sono fattori esogeni capaci di provocare malformazioni congenite quando le strutture embrionali si stanno sviluppando. Questi agenti si possono dividere in tre categorie: agenti fisici, agenti chimici e agenti biologici.
Fra le prime cause esogene ricordiamo gli effetti delle radiazioni ionizzanti (Giavini, 1981) La categoria degli agenti chimici è di grande attualità visto che in questo gruppo di sostanze sono compresi i farmaci, gli insetticidi, gli erbicidi, i fungicidi, i solventi organici, gli additivi alimentari ed i metalli pesanti. Tra le sostanze chimiche altamente teratogene ricordiamo la *diossina*, contaminante che ha suscitato notevole interesse in relazione alla questione dello smaltimento dei rifiuti. Tra i farmaci, l'esempio più eclatante è stato la *talidomide* (Pelagalli, 1976; Noden e De Lahunta, 1991). Anche certi metalli pesanti come il *mercurio* nella sua forma organica (metilmercurio) provocano malformazioni congenite nell'uomo, negli animali domestici e di laboratorio (Noden e De Lahunta, 1991). Alcuni alcaloidi contenuti nei vegetali possono avere, oltre ad un effetto tossico, un'azione teratogena. Tra gli agenti biologici ricordiamo gli agenti infettivi ad azione teratogena, come il virus della *rosolia* e il *toxoplasma gondii* in umana. In medicina veterinaria si è scoperto che le scrofe gravide

vaccinate con il virus attenuato della *peste suina* partorivano soggetti con una serie di malformazioni di gravità variabile a seconda del giorno di gestazione in cui veniva effettuato la vaccinazione (Noden e De Lahunta, 1991). Altri virus sono capaci di dare effetti teratogeni in diverse specie di interesse veterinario, tra questi il virus della *bluetongue* (bovino, pecora), il virus della *diarrea virale del bovino* (bovino, pecora, capra, maiale) e il virus dell'encefalite equina. Solo nel 13% delle malformazioni è possibile identificare una causa che può essere ereditaria, un agente ambientale o un teratogeno noto; nel 75% la causa è sconosciuta o classificata come potenzialmente ereditaria (Huston et al. 1978). La maggior parte dei difetti ha cause multifattoriali con interazioni tra la predisposizione genetica e uno o più agenti ambientali (Fraser 1959).

BIBLIOGRAFIA

Giavini E. e Leone V.G.: Teratologia, Piccin Editore (1981): 2-19.

Fraser, F.C. (1959): Causes of congenital malformations in man. J. Chron. Dis. 10, 97–110.

Hamori, D. (1983): Constitutional disorders and hereditary diseases in domestic animals. In: Developments in animal and veterinary sciences 11. Amsterdam, Oxford, New York. Elsevier, p 553.

Hiraga, T., Dennis, S. (1993): Congenital duplication. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9, 145–161.

Hoffmann, J. (1968): Doppelmissbildungen (Polymelie und Anus duplex) bei einem Hühnerküken. Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 512–514.

Huston, R., Saperstein, G., Schoneweis, D., Leipold, H. (1978): Congenital defects in pigs. Vet. Bullet. 48, 645–675.

Mulley, R.C., Edwards, M.J. (1984): Prevalence of congenital abnormalities in pigs. Aus. Vet. J. 61, 116-120.

Noden D.M., De Lahunta A.: Embriologia degli animali domestici (Sviluppo normale e malformazioni congenite), Edi-Ermes (1991): 84-95 e 204-219.

Pelagalli G.V.: Embriologia e teratologia, Idelson (1976): 105-108 e 377-415.

Pohlmeyer, K. (1974): Notomelie beim Kalb. Dtsch. tierärztl. Wschr. 82, 190–195.

Ramadan, R., Abdin-Bey, M., Al-Holaibi, A. (1998): Notomelia in goats and calf. Pakistan Vet. J. 18, 47–49.

Rivera, R., Hootnick, D., Gingold, A., Levinsohn, E., Kruger, L., Packard, D. (1999): Anatomy of a duplicated human foot; a limb with fibular dimelia. Teratology 60, 272–282.

Schönfelder, A., Wittek, T., Sobiraj, A. (2003): Die Polymelie beim Kalb – Übersicht mit Fallbeschreibung zur operativen Behandlung. Tierärztl. Prax. 31 (G), 294– 355.

DEMISCELAZIONE PER ELUTRIAZIONE DI DIFFERENTI PREMISCELE MEDICATE A BASE DI AMOXICILLINA

DEMIXING BY ELUTRIATION OF DIFFERENT AMOXICILLIN MEDICATED PREMIXES IN FEED

BOUSQUET E.[1], ROUSSEAU C.[1], SEGOT C.[1] , GUICHERD A.[2], GOUTALIER J.[2], MONTANARI L.[3]

[1]*Virbac 06511 Carros France,* [2]*Phatophy Lyon France ,*[3]*Virbac Milano Italia*
eric.bousquet@virbac.com

Parole chiave: Amoxicillina, premiscela medicata, demiscelazione, mangime, elutriazione.
Key words: Amoxicillin, medicated premix, demixing, feed, elutriation.

RIASSUNTO
Sono state saggiate quattro premiscele medicate a base di amoxicillina mediante test di elutriazione, allo scopo di valutare il rischio di demiscelazione durante la movimentazione attraverso l'impianto di produzione. La demiscelazione è stata significativamente inferiore in presenza di uno specifico processo di ricopertura dell'amoxicillina. Si discute sul rapporto tra dimensione delle particelle del mangime e delle premiscele medicate.

ABSTRACT
Four amoxicillin based premixes were tested according to the elutriation test in order to check for risk of demixing through transfer of medicated feeds in plants. Demixing was significantly lower for a specific coating process of amoxicillin. Consistency between feed and premix particle sizes is discussed.

INTRODUZIONE
La demiscelazione dei mangimi medicati è un aspetto di estremo interesse sia per i mangimisti che per i veterinari, in quanto responsabile della etereogeneicità dei mangimi e dell' aumento della variabilità del dosaggio degli antimicrobici somministrati tramite i mangimi medicati .
L'elutriazione è un fenomeno di demiscelazione dovuto alla differente velocità che le particelle di polvere hanno quando cadono nell'aria.
E' stato messo a punto, già descritto In studi precedenti, un test standardizzato per valutare sperimentalmente l'elutriazione delle polveri (1). Questo test è stato correlato con la demiscelazione a livello di sito produttivo dei mangimi integrati (2) e già realizzato in passato su una gamma di premiscele medicate (3-4).
Obiettivo di questo studio è stato di completare i test di elutriazione su 4 premiscele medicate registrate in Europa.

MATERIALI E METODI
In un mangime pre-starter (dimensione mediana delle particelle 390 μm) sono state testate quattro premiscele medicate contenenti rispettivamente 5% (*Suramox®* /*Stabox®*

- Virbac,(A) *Vetrimoxin®* – Ceva,) e 10% (*(B) Amoxipol®* – Polichem, (*C) Maymoxi®* – Maymo) di amoxicillina (espressa come base). La mediana delle dimensione delle particelle dei 4 prodotti veniva valutata tramite granulometria – laser.
Ogni premiscela medicata veniva analizzata in doppio al fine di effettuare l'analisi statistica, ogni premiscela medicata veniva aggiunta a 1 kg di mangime sfarinato fino al raggiungimento del livello di inclusione raccomandato (400 ppm di amoxicillina nel mangime). 500 ppm di un tracciante venivano poi aggiunti al mangime per la validazione del test.
Per ogni analisi un campione di 300 ml di mangime veniva introdotto e lasciato cadere in un tubo di 8 metri d'altezza. Alla fine della caduta venivano prelevati 2 campioni da 50 ml, rispettivamente sul fondo e in superfice e si procedeva all'identificazione del tracciante tramite colorimetria e dell'amoxicillina tramite analisi HPLC. Partendo da un indice definito in precedenza (5), per ogni saggio veniva calcolato l'Indice di Elutriazione (EI) sia per il tracciante che per l'amoxicillina (dove Ct e Cb erano rispettivamente le concentrazioni nei campioni presi in superficie e sul fondo).

$$EI = \frac{Ct - Cb}{\left[\frac{Ct + Cb}{2}\right]} x100$$

I valori dell' indice variano da -200 a +200, i valori estremi corrispondono alla demiscelazione massima mentre il valore 0 corrisponde all' assenza di demiscelazione. Veniva poi condotta un'analisi non parametrica della varianza sui diversi livelli per comparare l'EI tra i prodotti.

RISULTATI
Per Suramox® /Stabox ® l' EI dell'amoxicillina risultava inferiore rispetto agli altri prodotti testati.

TABELLA dimensione mediana delle particelle di principio attivo e media dell' indice di elutriazione (EI) dei 4 prodotti testati

	Dimensione delle particelle (μm)	EI
Suramox®	380	1.4 ± 16.6
A	878	-89.4 ± 14.3*
B	902	-137.2 ± 3.4**
C	188	95.1 ± 17.4*

*, ** : significatività differente per Suramox® (rispettivamente $p<0.05$ e $p<0.005$)

DISCUSSIONE
Per i prodotti con EI negativo elevato, dopo il test l'amoxicillina è più concentrata sul fondo del campione (le particelle di amoxicillina troppo grandi o troppo pesanti cadono più velocemente all'interno delle particelle di grandi dimensioni del mangime).

Per i prodotti con EI altamente positivo, dopo il test l'amoxicillina è più concentrata nella parte più superficiale del campione (le particelle di amoxicillina piccole cadono più lentamente delle particelle di mangime di piccola dimensione). Ciò si evidenzia con la media della dimensione delle particelle superiore rispetto a quella del mangime per i prodotti con EI altamente negativo (prodotto A e B) con la mediana delle dimensioni delle particelle inferiore rispetto a quella del mangime per i prodotti con EI altamente positivo (prodotto C).
La minor demiscelazione riscontrata con Suramox® /Stabox® potrebbe essere dovuta alla particolare dimensione delle particelle di amoxicillina a seguito dello specifico processo di ricopertura (dimensione mediana delle particelle : 380 μm), in linea con la dimensione media delle particelle del mangime (390 μm) (Fig 1 e 2) .

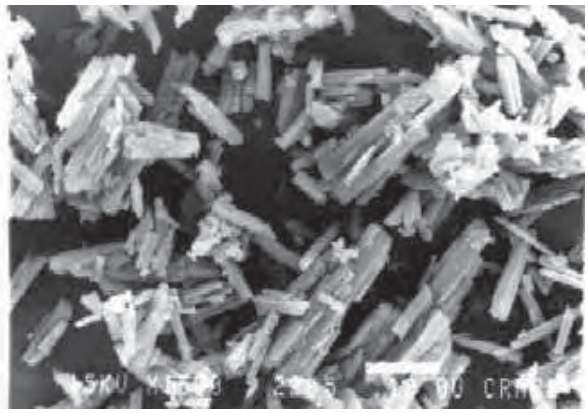


Fig. 1 Cristalli di amoxicillina (x 300): Dimensione delle particelle 20-80 μm

Fig. 2 Micro granuli di amoxicillina (x 40) in una matrice di ricopertura idrofilica (Suramox®/Stabox®-Virbac): mediana dei diametri delle particelle 380 μm

Ringraziamenti
Gli autori ringraziano Fabrice Putier e Marianne Jousselin di Tecaliman (Francia) per aver condotto i test di elutriazione .

BIBLIOGRAFIA

1 Amornthewaphat N., Behnke K.C., Hancock J.D. (1998) "Effects of particle size and mixing time on uniformity and segregation in pig diets" in: Kansas State University Day Report, 261-263.

2 Putier F., Bousquet E. (2004) "Evaluation of a product repartition stability in a mixing of powders by a simple test : the elutriation" in: 4ème Colloque Science et Technologie des poudres, Compiègne, France.

3 Bousquet E., Putier F., Goutalier J., Paris T. (2004). "Demixing by elutriation of different amoxicillin medicated premixes in various feeds » in: 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg Germany, 549.

4 Bousquet E., Sanquer A., Combeau S, Goutalier J. (2006). "Demixing by elutriation of different amoxicillin medicated premixes in various feeds » in: 19th International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen Denmark, 429.

5 Williams J.C., Shields G. (1969) "The segregation of granules in a vibrated bed". Powder Technol 1, 134-142.

STABILITA' NEL MANGIME PELLETTATO DI DIFFERENTI PREMISCELE MEDICATE A BASE DI AMOXICILLINA

STABILITY OF DIFFERENT AMOXICILLIN MEDICATED PREMIXES IN PELLETED FEED

BOUSQUET E.[1], CANO G.[2], GUICHERD A.[3], GOUTALIER J.[3], MONTANARI L.[4]

[1]*Virbac 06511 Carros France;* [2]*Tests and Trials Lleida Spain;* [3]*Phatophy Lyon France,*
[4]*Virbac Milano Italia*
eric.bousquet@virbac.com

Parole chiave: Amoxicillina, mangime medicato pellettato, stabilità
Key words: Amoxicillin, medicated pelleted feed , stability

RIASSUNTO : E' stato condotto uno studio di comparazione della stabilità dell'amoxicillina in un mangime "grower" per suini supplementato con differenti premiscele medicate registrate in Europa. Dopo pellettatura e stoccaggio del mangime per 14 giorni in condizioni standardizzate la degradazione inferiore è stata riscontrata in presenza di un processo specifico di ricopertura dell'amoxicillina (*Suramox*®/*Stabox*®-Virbac). I livelli di degradazione per gli altri prodotti sono in linea con studi condotti in precedenza.

ABSTRACT:
A study was performed to compare amoxicillin stability in a grower feed supplemented by different medicated premixes registered in Europe. A lower degradation was recorded with a specific coating process of amoxicillin (*Suramox*®/*Stabox*®-Virbac) after pelletization and storage of feed in standardized conditions during 14 days. Degradation levels for the other products were consistent with previous studies.

INTRODUZIONE

E' stato precedentemente dimostrato l'interesse di un processo di ricopertura specifico dell'amoxicillina (Suramox®)per proteggere il principio attivo dalla degradazione nel mangime pellettato. Diversi studi comparativi di laboratorio in Europa, sia pilota che su scala industriale, mostrano con questo processo di ricopertura una migliore protezione dell'amoxicillina contro la degradazione durante la pellettatura e la conservazione del mangime (3-4).
L'obiettivo del presente studio è stato di completare i dati di stabilità dell'amoxicillina nel mangime pellettato a livello industriale con l'utilizzo di diverse premiscele medicate registrate in Europa.

MATERIALI E METODI

Sono state testate cinque premiscele medicate contenenti rispettivamente 5% (*Suramox*□/ *Stabox*®-Virbac, Zoobiotic® – Calier *(A),Vetrimoxin*® - Ceva *(B), Hipramix*® – Hipra *(C)* e 10% (*Rhemox*® – Invesa *(D))* di amoxicillina (espressa come base) presso un mangimificio spagnolo .
Con ogni premiscela medicata veniva supplementato un lotto di mangime per suini

”grower” a una concentrazione di 400 ppm di amoxicillina (mg di amoxicillina per kg di mangime). Per evitare la contaminazione crociata tra 2 lotti medicati si procedeva alla produzione di un lotto di mangime ”bianco” senza supplementazione. La dimensione di ogni lotto di mangime medicato era, per tutti i lotti, pari a 3 tonnellate.
La quantità di ogni premiscela medicata veniva accuratamente pesata per calcolare esattamente la concentrazione di amoxicillina nel mangime.
La pressione di vapore era uguale a 4 atm e la temperatura variava prima della pellettatura da 53,7 a 65,5 C°, dopo la pellettatura da 71,3 a 75,2 C°. Sei campioni di ogni lotto di mangime medicato venivano prelevati dopo il raffreddamento dei pellet ad intervalli regolari coprendo l’intera fase produttiva finale di rilascio del lotto.
I campioni venivano analizzati al ricevimento (T0) da parte del laboratorio (Phatophy). Contemporaneamente 3 aliquote per lotto dei 6 campioni venivano conservati per 14 giorni in condizioni standardizzate (25°C, 60% di umidità relativa (RH)) prima dell’analisi (T14).
La concentrazione del principio attivo nell’alimento era determinata con HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione con individuazione UV). Ogni campione era analizzato in doppio e veniva calcolata la concentrazione media.

RISULTATI
Al T0 la degradazione media variava da 10.2% a 39.3%.
Per tutti i prodotti ad eccezione di *Suramox®* /*Stabox®* si rendeva evidente durante lo stoccaggio una ulteriore degradazione . Al T14 tale degradazione si attestava per i prodotti *A, B, C* and *D* tra 18.3% e 53.1%.

TABELLA Concentrazione media di amoxicillina al T0 e dopo 14 giorni di stoccaggio (T14) (espressa come percentuale della concentrazione teorica)

Prodotto	T0 (n=6)	T14 (n=3)
Suramox®	89.8%	91.2%
A	87.6%	81.7%
B	75.6%	64.0%
C	60.7%	46.9%
D	68.7%	56.0%

DISCUSSIONE
Per *Suramox®* /*Stabox®* la degradazione si limitava a circa il 10% senza una incremento significativo durante lo stoccaggio (entro i limiti di variabilità analitica). Per gli altri prodotti la degradazione evidenziata era invece in linea con studi precedenti, condotti sul mangime medicato per suini successivamente alla pellettatura e all’ eventuale stoccaggio (3-4).
Questo studio conferma che un processo specifico di ricopertura del principio attivo può ridurre la degradazione a seguito della pellettatura e della conservazione del mangime.

BIBLIOGRAFIA

1 Derrieu G.,Raynier B., Ascher F., Gardey L. (2000) « Interest of a stabilized amoxicillin in feedstuffs manufacturing". Rev. Med. Vet. 151, 109-117.

2 Bousquet E., Lemaire F., Sanquer A., Haas Z., Hruby A., Maxa J., Zemanova M., Hera A. (2006) "Amoxicillin oral treatment in pigs via feed : medicated feed manufacture and analytical issues J. Vet. Pharmacol. Therap., 29 (Suppl. 1), 81-82.

3 Bousquet E., Derrieu G., Raynier B., Segot C., Lemaire F. Sanquer A., Casado P., Coll Masvidal T., Morillo Alujas A., Cano Lopez G., Villalba Mata D., Goutalier J., Combeau S. (2006) «Estudio comparativo de distinctas premezclas a base de amoxicillina (homogeneidad y estabilidad en el pienso)". in: 27th Symposium Anual de Anaporc, Badajoz Spain, 14-16 november 2006, 185-188.

4 Bousquet E., Haas Z., Goutalier J., Guicherd A. (2008) ".Estabilidad de varias premezclas medicamentosas compuestas de amoxicilina en el pienso" in: 29th Symposium Anual de Anaporc, Cordoba Spain, 18-20 november 2008.

STABILITA' NEL MANGIME SFARINATO DI DIFFERENTI PREMISCELE MEDICATE A BASE DI AMOXICILLINA

STABILITY OF DIFFERENT AMOXICILLIN MEDICATED PREMIXES IN FLOUR FEED

BOUSQUET E.[1], CANO G.[2], GUICHERD A.[3], GOUTALIER J.[3], MONTANARI L.[4]

[1]*Virbac 06511 Carros France;* [2]*Tests and Trials Lleida Spain;* [3]*Phatophy Lyon France,* [4]*Virbac Milano Italia*
eric.bousquet@virbac.com

Parole chiave: Amoxicillina, mangime medicato sfarinato, stabilità
Key words: Amoxicillin, medicated flour feed , stability

RIASSUNTO :
E' stato condotto uno studio di comparazione della stabilità dell'amoxicillina in un mangime in farina "grower" per suini supplementato con differenti premiscele medicate registrate in Europa. Dopo stoccaggio del mangime per 14 giorni in condizioni standardizzate, la degradazione inferiore è stata riscontrata in presenza di un processo specifico di ricopertura dell'amoxicillina (Suramox®/Stabox®-Virbac). Questo studio conferma che, nel mangime, l'amoxicillina può subire un danno anche in assenza di pellettatura

SUMMARY :
A study was performed to compare amoxicillin stability in a flour grower feed supplemented by different medicated premixes registered in Europe. A lower degradation was recorded with a specific coating process of amoxicillin (Suramox®/Stabox®-Virbac) after storage of feed in standardized conditions during 14 days. This study confirmed that amoxicillin may be damaged in feed even without pelletization.

INTRODUZIONE
L'interesse di un processo specifico di ricopertura dell'amoxicillina (Suramox®) per proteggere il principio attivo dalla degradazione nel mangime medicato è già stato dimostrato precedentemente (1-2). Diversi studi comparativi di laboratorio in Europa, sia pilota che su scala industriale, mostrano con questo processo di ricopertura una migliore protezione dell'amoxicillina contro la degradazione durante la pellettatura e la conservazione del mangime (3).
In alcuni paesi si utilizza mangime medicato sfarinato (senza pellettatura), obiettivo del presente studio è quello di completare i dati di stabilità dell'amoxicillina nel mangime sfarinato prodotto su scala industriale utilizzando diverse premiscele medicate registrate in Europa.

MATERIALI E METODI
Sono state testate cinque premiscele medicate contenenti rispettivamente 5% *(Suramox®/ Stabox®*-Virbac, (A) Zoobiotic® – Calier, *(B) Vetrimoxin®* – Ceva, *(C) Hipramix®* – Hipra) e 10% ((*D) Rhemox®* – Invesa) di amoxicillina (espressa come base) in un mangimificio spagnolo .

Con ogni premiscela medicata veniva supplementato un lotto di mangime per suini "grower" a una concentrazione di 400 ppm di amoxicillina (mg di amoxicillina per kg di mangime). Per evitare la contaminazione crociata, tra 2 lotti medicati si procedeva alla produzione di un lotto di mangime "bianco" senza supplementazione. La dimensione di ogni lotto di mangime medicato era, per tutti i lotti, pari a 3 tonnellate.
La miscelazione delle materie prime nel miscelatore, dove la premiscela medicata veniva aggiunta manualmente, si protaeva per 2,5 minuti.
La quantità di ogni premiscela medicata veniva accuratamente pesata per calcolare esattamente la concentrazione di amoxicillina nel mangime.
Tre campioni di ogni lotto di mangime medicato venivano prelevati ad intervalli regolari per coprire l'intera fase di svuotamento del miscelatore .
I campioni venivano conservati per 14 giorni in condizioni standardizzate (rispettivamente 30°C e 40°C, 65% di umidità relativa (RH)) prima dell'analisi (T14).
La concentrazione dell'amoxicillina nell'alimento era determinata con HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione con individuazione UV). Ogni campione era analizzato in doppio e veniva calcolata la concentrazione media.

RISULTATI
Il livello di degradazione inferiore veniva registrata per *Suramox®*/*Stabox®* (6.1% e 13.9% dopo conservazione rispettivamente a 30°C e 40°C) rispetto agli altri prodotti (la degradazione si attestava da 30,5% a 44,4% e da 45,2% a 60,3% dopo conservazione rispettivamente a 30°C e 40°C).

TABELLA Concentrazione media di amoxicillina dopo 14 giorni di stoccaggio (espressa come percentuale della concentrazione teorica)

Prodotto	Stoccaggio a 30°C	Stoccaggio a 40°C
Suramox®	93.9%	86.1%
A	69.5%	54.8%
B	60.4%	50.9%
C	55.6%	42.5%
D	61.4%	39.7%

DISCUSSIONE
La degradazione durante lo stoccaggio era già stata evidenziata in precedenza con test di laboratorio dove il mangime sfarinato veniva conservato per 15 gg a 40°C e 95% di umidità relativa : in linea con gli attuali risultati la degradazione si attestava al 10% per *Suramox®*/*Stabox®* e al 50% per gli altri prodotti.(3)
Questo studio conferma che l'amoxicillina può essere degradata nel mangime durante il trasporto o lo stoccaggio in funzione delle condizioni di temperatura e umidità riscontrabili in Europa (in particolare quando il mangime è stoccato nei silos durante il periodo estivo) sia in presenza o no di pellettatura.
In tali condizioni un processo specifico di ricopertura del principio attivo può ridurne la degradazione .

BIBLIOGRAFIA

1 Derrieu G.,Raynier B., Ascher F., Gardey L. (2000) « Interest of a stabilized amoxicillin in feedstuffs manufacturing". Rev. Med. Vet. 151, 109-117.

2 Bousquet E., Lemaire F., Sanquer A., Haas Z., Hruby A., Maxa J., Zemanova M., Hera A. (2006) "Amoxicillin oral treatment in pigs via feed : medicated feed manufacture and analytical issues J. Vet. Pharmacol. Therap., 29 (Suppl. 1), 81-82.

3 Bousquet E., Derrieu G., Raynier B., Segot C., Lemaire F. Sanquer A., Casado P., Coll Masvidal T., Morillo Alujas A., Cano Lopez G., Villalba Mata D., Goutalier J., Combeau S. (2006) «Estudio comparativo de distinctas premezclas a base de amoxicillina (homogeneidad y estabilidad en el pienso)". in: 27th Symposium Anual de Anaporc, Badajoz Spain, 14-16 november 2006, 185-188.

CASO DI RABDOMIOMA COME REPERTO DI MACELLAZIONE

RHABDMYOMA AT THE SLAUGHTER-HOUSE: A CASE REPORT

COCUMELLI C.[1], PERRONE V.[2], FALCHI A.[1], CITO G.[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana;* [2] *Az.USL Roma B, Servizio Veterinario*

Parole chiave: Rabdomioma, Suino, Neoplasia cardiaca
Key Words: Rhabdomyoma, Swine, Cardiac Neoplasia

RIASSUNTO
Il presente lavoro riporta un caso di rabdomioma cardiaco in un suino regolarmente macellato. Il tumore descritto è considerato raro, ha decorso benigno e non determina sintomatologia clinica. Il presente caso suggerisce la validità dell'esame ispettivo al macello sia come tutela della sicurezza alimentare, sia come punto di partenza per la raccolta di dati a carattere epidemiologico.

ABSTRACT
This paper reports the occourrence of heart rhabdomyoma in a regularly slaugthered swine. This is a rare benign neoplasia, that occour with no clinical evidence . This case report underline the relevance of the post-mortem examination both for food safety and for epidemiology aspects.

INTRODUZIONE
Il rabdomioma è un raro tumore primario benigno, descritto nell'uomo ed in diverse specie animali, che origina dal muscolo striato. I pochi dati sinora disponibili sull'incidenza fra le neoplasie si attestano intorno allo 0,02%. In circa un terzo dei casi la lesione è localizzata nel miocardio; siti meno comuni includono la laringe, il diaframma, la lingua ed il derma, dove l'insorgenza sembra derivare da cellule mesenchimali capaci di differenziare verso cellule muscolari striate. Il suino è la specie in cui è più frequentemente segnalato, spesso come reperto accidentale di macellazione.
La classificazione, che riprende quella umana, ne identifica una forma fetale, a sviluppo intrauterino, ed una che insorge in soggetti prevalentemente giovani e sub-adulti. In letteratura sono descritti alcuni fattori predisponenti, come il sesso femminile e la razza Red Wattle, razza suina americana comunque non presente in Italia.
Spesso la forma cardiaca evolve in assenza di sintomatologia. La lesione neoplastica è più frequentemente localizzata nella parete del ventricolo sinistro e nel setto interventricolare; generalmente si presenta con formazioni nodulari singole o multiple, di colore grigio-giallastro e consistenza solida, senza capsula ma ben delimitate dal tessuto circostante e con dimensioni variabili tra pochi millimetri a 3 cm di diametro. In letteratura spesso vengono descritti noduli di diametro di circa 1-1,5 cm. Sporadicamente la neoplasia può presentarsi in forma sessile o polipoide e sporgere al di sotto di epicardio od endocardio.
Il presente lavoro riporta il caso di un rabdomioma in un suino regolarmente macellato.

MATERIALI E METODI

Il reperto descritto nel presente lavoro deriva da un suino appartenente ad una partita di 140 capi provenienti da un allevamento intensivo del Nord Italia ed inviati nel mese di ottobre 2009 presso uno stabilimento di macellazione di Roma. Il soggetto non presentava sintomi di malattia né alterazioni clinicamente evidenti, e veniva regolarmente avviato alla macellazione dopo l'ispezione *ante mortem*. All'ispezione *post mortem* si osservava un ingrandimento del cuore e una zona di maggiore consistenza alla palpazione. L'organo è stato inviato al laboratorio di Anatomo-istopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana per ulteriori accertamenti. Sul cuore è stato approfondito l'esame anatomopatologico e sono stati effettuati prelievi di tessuto cardiaco in diverse sedi; i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inviati al laboratorio per l'esame istopatologico, effettuato secondo le tecniche routinarie.

RISULTATI

L'osservazione macroscopica ha permesso di confermare l'aumento di volume del miocardio ed evidenziare l'alterazione del profilo del cuore destro; alla palpazione è stato possibile apprezzare un area di consistenza modificata localizzata appena al di sotto del solco coronario destro. Al taglio si sono messi in evidenza noduli multipli di dimensioni variabili da pochi millimetri ad alcuni centimetri di diametro, disseminati nella muscolatura di entrambi i ventricoli e nel setto interventricolare; in particolare sul ventricolo destro viene evidenziato un grosso nodulo di 3 x 3 cm, non capsulato, di colore grigio-giallastro e di consistenza dura (Figura 1). Il preparato istologico, colorato con ematossilina-eosina, mostrava tessuto cardiaco normale circondante una neoformazione ben delimitata (Figura 2), priva di capsula fibrosa, composta da grosse cellule di origine muscolare, con nuclei di aspetto pleomorfo, alcuni di grandi dimensioni e dotati di un singolo nucleolo, quando visibile; il citoplasma si presentava vacuolizzato conferendo alle cellule il tipico aspetto di "spider-cell" (Figura 4), assenti le mitosi.

DISCUSSIONE

Le lesioni anatomopatologiche e l'esame istopatologico hanno permesso di classificare la neoformazione come rabdomioma. L'aspetto uniforme della popolazione cellulare, e l'assenza di mitosi ha permesso di discriminare la lesione dalla sua controparte maligna, il rabdomiosarcoma, dove la popolazione cellulare è immersa in una matrice mixomatosa od organizzata in strati compatti, composta da cellule allungate, a vortice e rotonde, con nuclei di dimensione e posizione variabile. Ad oggi non sono, inoltre, descritti casi di rabdomiosarcoma cardiaco nel suino. La diagnosi differenziale dal punto di vista macroscopico deve prendere in considerazione noduli tubercolari, granulomi actinomicotici, lesioni ascessuali oltre ad altre neoplasie come linfomi, leiomiomi e fibromi. Data la localizzazione esclusivamente cardiaca e l'assenza di metastatizzazione, l'esame anatomopatologico degli altri organi permette di escludere queste patologie; l'esame istologico invece consente di effettuare una diagnosi certa, spesso anche eziologica.

CONCLUSIONI

L'ispezione *post-mortem* ha permesso di portare alla luce una lesione descritta raramente in bibliografia confermando, anche in un caso decisamente sporadico, la validità delle operazioni ispettive (ancorchè innovate dal Reg. n. 854/2004) ed il ruolo del macello come punto privilegiato per l'acquisizione di dati scientifici oltre che fondamentale a garanzia della sicurezza alimentare.

BIBLIOGRAFIA

McEwen BJ., (1994) Congenital cardiac rhabdomyomas in red wattle pigs, Can Vet J., 35(1):48-9.

Tanimoto T, Ohtsuki Y., (1996), The pathogenesis of so-called cardiac rhabdomyoma in swine: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study, Virchows Arch., 428(1):69.

Meuten D.J., (2002), Tumors of muscles. In Tumors in domestic animals., , Iowa State Press, Ames, Iowa, Donald J. Meuten ed.

Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H., Walder E.J., (1998), Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals, Volume 2, Second Series, Armed Forces Institute of Pathology, WHO.

Marcato P.S. (2002), Patologia Sistematica Veterinaria, Edagricole, Bologna (Italia).

ICONOGRAFIA

Figura 1. Foto macroscopica del cuore, in cui è possibile apprezzare la presenza di noduli (frecce), di aspetto grigiastro e di dimensioni variabili da alcuni mm a 3 cm di diametro.

Picture 1. Macroscopic aspect of the heart, showing multiple, grey-yellowish nodules intersperse through both ventricular walls, with size variable from few millimeters to 3 centimeters.

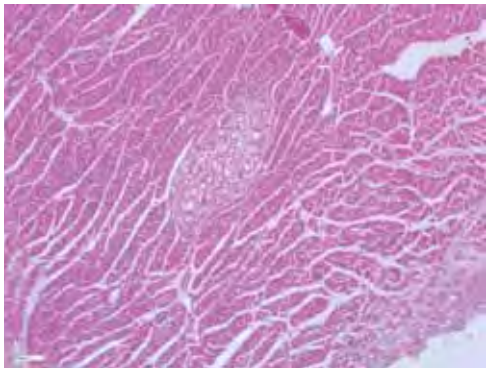


Figura 2. Preparato istologico del miocardio. E' possibile apprezzare un nodulo di piccole dimensioni, circondato da tessuto muscolare sano e privo di capsula fibrosa [E.E. - 4x].

Picture 2. Microscopic view of the heart, showing small nodule embedded in normal myocytes with no fibrotic capsule surrounding it.

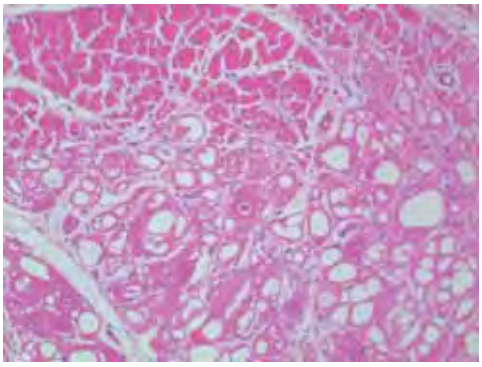


Figura 3. Particolare di un punto di passaggio fra tessuto muscolare normale (in alto) e neoplastico (in basso). [E.E. - 10x]

Picture 3. Microscopic view of the heart showing the gradual modification between normal myocytes and neoplastic one.

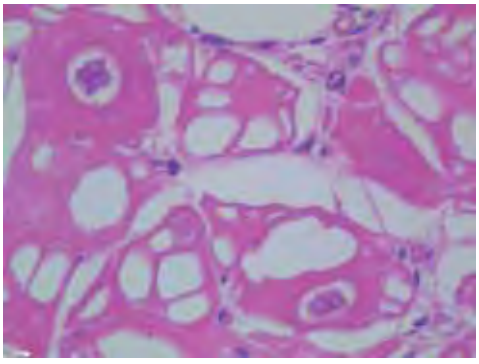


Figura 4. Particolare a forte ingrandimento dell'aspetto delle "spider-cell". [E.E. - 40x]

Picture 4. High microscopic view of spider-cell.

EFFETTI DELLA PRESENZA DELLA CODA DURANTE LA FASE DI SVEZZAMENTO NELLO SVILUPPO DI LESIONI IN SUINETTI MASCHI E FEMMINE

THE EFFECTS OF TAIL PRESENCE DURING WEANING AGE IN THE DEVELOPMENT OF LESIONS IN MALE AND FEMALE PIG WEANERS

[1]DI MARTINO G., [1]BONFANTI L., [1]CAPELLO K., [1]PATREGNANI T., [1]STEFANI A., [1]SCHIAVON E., [2]GOTTARDO F.

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;
[2] Dipartimento di Scienze Animali,Università degli Studi di Padova

Parole chiave: morsicatura della coda, morsicatura delle orecchie, TIM, suinetto, punteggiatura delle lesioni
Key words: tail biting, ear biting, TIM, weaner, lesion score

Riassunto. In un sito di svezzamento di suini commerciali per la produzione del suino pesante italiano sono stati valutati, attraverso 3 rilevazioni, gli effetti del sesso e della presenza della coda in relazione all'insorgenza di *tail in mouth* (TIM) e di lesioni sul corpo, sulle orecchie e sulla coda. I risultati evidenziano, nei soggetti maschi rispetto alle femmine, un rischio 2 volte più elevato di subire lesioni alle orecchie e un rischio 18 volte superiore di subire lesioni alla coda durante l'ultima fase di svezzamento. L'analisi dei dati rileva inoltre che la presenza della coda può rappresentare un fattore protettivo nei confronti delle orecchie. Sono stati considerati tutti i tipi di lesioni legate all'aggressività: le lesioni sul corpo e sulle orecchie risultano più gravi e frequenti nell'immediato post accasamento nel sito di svezzamento, mentre quelle alle code presentano frequenza costante con un marcato aumento della gravità a fine svezzamento.

Abstract. The effects of sex and tail presence have been evaluated in relation to "tail in mouth" behaviour (TIM) as well as in regards to body, ear, and tail lesion outbreak through 3 surveys in a weaning unit of commercial pigs for Italian heavy pig production. The results highlight an ear-damage risk 2 times higher in males than in females and a tail-damage risk 18 times higher in males compared to females during the last survey implemented at the end of weaning age. Hence, tail presence may represent a protective factor for ear lesions. This work has considered all types of lesions associated to aggressiveness: body and ear lesions emerge to be more severe and intense in frequency immediately after housing in the weaning unit, whereas tail lesions are consistent in frequency registering an increase in lesion severity at the end of weaning age.

INTRODUZIONE

Il programma d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali basandosi sulle nuove evidenze scientifiche e tenendo conto della sensibilità della società civile e delle problematiche socioeconomiche e commerciali ritiene ormai non più condivisibile operare mutilazioni sugli animali da reddito quali normali pratiche zootecniche. Nel caso della specie suina la normativa vigente (D.Lgs. 20 febbraio 2004 n.53) autorizza la caudectomia solo in caso di comprovata necessità e non come intervento routinario preventivo. In alcuni casi risulta

peraltro difficile, a livello di allevamento, controllare l'aggressività di taluni soggetti o di gruppi di animali, con l'inevitabile conseguenza di assistere al verificarsi di morsicature (*tail biting*) e, nei casi estremi, di lesioni caudali molto gravi (ascessi spinali e piemia). A questo proposito l'EFSA ha prodotto nel 2007 un Report che riassume i pareri scientifici espressi dal gruppo di esperti sulla salute e il benessere dei suini e contestualmente propone strategie alternative al taglio delle code.
Il *tail biting* è una stereotipia derivante dall'impossibilità di espletamento del *pattern* comportamentale attraverso attività esplorativa/grufolativa, ma risulta estremamente complesso per la sua caratteristica multifattorialità legata ad aspetti ambientali, genetici e nutrizionali (Schrøder-Petersen e Simonsen, 2001).
Il fenomeno consta di due fasi, una pre-lesiva di masticamento e suzione incruenti della coda o *tail in mouth* (TIM) ed una fase lesiva con presenza di lesioni e sanguinamento. Nella prima fase non sono ancora visibili danni macroscopici, ma una possibile infiammazione a livello istologico e una perdita di setole all'apice della coda (Simonsen et al., 1991; Treuthardt, 2001); nella seconda fase invece le ferite possono rapidamente assumere gravità e proporzioni allarmanti ad opera della forte eccitazione provocata dall'odore del sangue.
Per quanto riguarda la correlazione con il sesso, la maggior parte degli studi effettuati al macello su suini leggeri (Report EFSA 2007) sembra suggerire un rischio considerevolmente più alto per i soggetti maschi (sia castrati che interi) di subire lesioni alla coda rispetto ai soggetti di sesso femminile.
I dati raccolti in fase di macellazione concordano con quelli ottenuti *in vivo* da Penny et al. (1981), che rilevano un più alto livello di *tail biting* in gruppi unisessuali di maschi interi rispetto a gruppi unisessuali femminili, tuttavia sono in disaccordo con i lavori di Blackshaw (1981), Breuer et al. (2003) e Van De Weerd et al. (2005), che non rilevano differenze significative tra gruppi unisessuali di femmine e maschi interi e con i dati di Zonderland et al (2003), che non risultano conclusivi nel definire una forte correlazione tra composizione sessuale del gruppo (in relazione ad un diverso rapporto maschi/femmine) e *tail biting*.
Lo studio di Schrøder-Petersen et al. (2003), in relazione al TIM, ha evidenziato come tale comportamento fosse più frequente in gruppi misti piuttosto che in gruppi unisessuali e come i maschi avessero una minor tendenza a praticare TIM rispetto alle femmine; tale differenza probabilmente dipende da una maggiore precocità sessuale di queste ultime, che le rende più attive nell'investigazione ano-genitale, particolarmente rivolta verso soggetti interi di sesso opposto.
Sebbene sia molto difficile prevedere l'età di insorgenza del *tail biting*, la maggior parte degli studi colloca il periodo più critico tra i 90 e i 150 giorni di vita in fase di ingrasso (Aalund, 1978; Haske et al., 1979; Sambraus, 1985; Olsson e Hederstrøm, 1989; Schrøder-Petersen e Simonsen, 2001). In particolare ben conosciuti sono gli esiti del *tail biting* durante la fase di ingrasso, mentre meno chiari sono i meccanismi del suo sviluppo nel periodo che intercorre tra separazione dalla scrofa e l'ingrasso (fase di svezzamento o fase 2). Sono inoltre poco note le possibili relazioni con la presenza di lesioni registrate in altre parti del corpo.

MATERIALI E METODI

La ricerca, che ha avuto una durata di 8 settimane, è stata realizzata presso un capannone di svezzamento all'interno di un *multisite* di una grossa filiera produttiva.
Per la prova sono stati selezionati 740 lattonzoli ibridi commerciali (370 maschi castrati e 370 femmine) provenienti dalla stessa scrofaia. Metà di questi soggetti sono stati sottoposti a caudectomia entro i tre giorni di vita. Nella fase di accasamento nel sito 2 (24 giorni

dopo la nascita) i suinetti sono stati rimescolati in base al sesso e alla presenza/assenza della coda. La struttura utilizzata era costituita da 20 box di gruppo con pavimentazione in grigliato parziale ed una superficie di 14 m^2, in ciascuno dei quali sono stati stabulati 37 capi (0,38 m^2/capo). I suinetti hanno ricevuto un'alimentazione liquida razionata distribuita 4 volte al giorno in una mangiatoia lineare. L'acqua era a disposizione *ad libitum* attraverso abbeveratoi a succhiotto. Nei box non erano presenti arricchimenti ambientali.
Il disegno sperimentale adottato ha considerato l'effetto del sesso (maschi castrati *vs* femmine) e della presenza/assenza della coda, per un totale di 4 gruppi:

1. maschi con coda: 185 capi disposti in 5 box;
2. maschi senza coda: 185 capi disposti in 5 box;
3. femmine con coda: 185 capi disposti in 5 box;
4. femmine senza coda: 185 capi disposti in 5 box.

Durante la prova sono state eseguite 3 punteggiature individuali a 5, 26, 47 giorni post accasamento per valutare, in 2 box per tesi, la localizzazione e la gravità delle lesioni di tutti gli animali presenti. Tali box sono stati scelti casualmente e sono stati sempre i medesimi nel corso delle 3 rilevazioni. Il sistema di punteggiatura è stato elaborato sulla base dei metodi proposti da Widowsky et al. (2002), Turner et al. (2005), Bracke (2007). Le aree sottoposte a osservazione sono state: il corpo (tronco, coscia e spalla), le orecchie e la coda. Punteggio 0 è stato attribuito in caso di assenza di lesioni; 1 presenza di una o più lesioni non gravi (graffi, arrossamento, ematomi da morsicatura); 2 presenza di una o più lesioni gravi (lacerazione con perdita di tessuto e copioso sanguinamento). A livello della coda è stato aggiunto nella seconda e terza rilevazione il controllo del TIM (0=assenza; 1=presenza), attraverso l'evidenziazione delle code bagnate e presentanti alopecie (Bracke 2007).
L'analisi statistica ha valutato l'effetto della variabile sesso e della variabile presenza della coda sul rischio di lesioni alle diverse parti del corpo e della coda. Per l'elaborazione dei dati è stato applicato il metodo denominato *generalized estimating equations* (GEE), tecnica alternativa alla classica regressione logistica nel caso di osservazioni raggruppate in clusters (box), utilizzando la stima robusta della varianza per il calcolo degli intervalli di confidenza. Quattro variabili *outcome* sono state individuate ed analizzate separatamente: presenza/assenza di lesioni alle orecchie, presenza/assenza di lesioni al corpo, presenza/assenza di lesioni alla coda e presenza/assenza di TIM. Sesso, presenza della coda ed interazione sono state introdotte nei modelli come variabili indipendenti. L'analisi è stata condotta separatamente per ogni rilevazione dei parametri. Per l'elaborazione è stato utilizzato il software STATA v9.0.

RISULTATI

Lesioni alle orecchie

Nello studio sono stati osservati nella prima rilevazione 236 casi di lesioni alle orecchie (82%), tale numerosità è scesa a 48 (17%) e 54 (19%) rispettivamente nella seconda e terza rilevazione.
L'analisi multivariata applicata ai dati delle lesioni alle orecchie non ha messo in luce effetti significativi dell'interazione sesso x coda in nessuna delle tre rilevazioni.
I fattori sesso e presenza/assenza coda non hanno influenzato significativamente la morsicatura delle orecchie nelle prime due rilevazioni, mentre al terzo controllo è emersa una probabilità 2 volte più elevata di lesioni alle orecchie per i maschi rispetto alle femmine ed un effetto protettivo della coda verso le orecchie (grafico 1). Questi effetti si traducono in termini di rischio con valori (*Odds Ratio*) pari a 2,56 (IC95%: 0,09-0,49) e 0,21 (IC95%: 1,27-5,21).

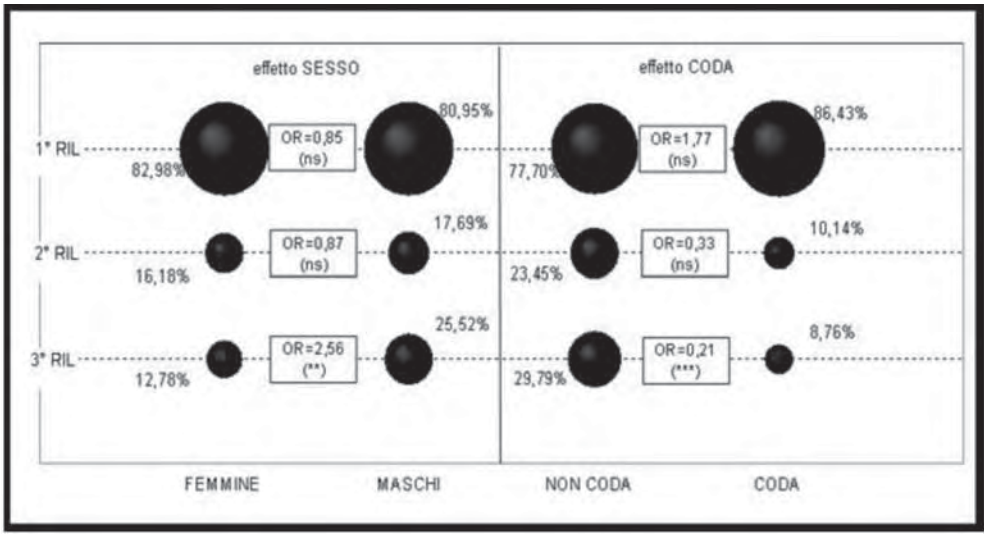


Grafico 1: sesso e presenza della coda come fattori di rischio per la morsicatura delle orecchie in suinetti in svezzamento *(sex and tail presence as ear biting risk factors in weaners)*

(**=p-value < 0,01; ***=p-value < 0,005)

Le lesioni più gravi alle orecchie (punteggio 2) sono più frequenti alla prima rilevazione (tabella 1). In ogni caso non risultano correlazioni statisticamente significative tra sesso, presenza/assenza di coda e gravità delle lesioni.

Tabella 1: casi di lesioni gravi alle orecchie in numero assoluto e percentuale nelle 3 rilevazioni *(absolute and percent values of severe ear lesions cases in the 3 surveys)*

Rilevazione		**T_5**				**T_{26}**				**T_{47}**			
Sesso		**Femmine**		**Maschi**		**Femmine**		**Maschi**		**Femmine**		**Maschi**	
Coda		**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**
N. capi		74	67	74	73	71	65	74	73	69	64	72	73
Lesioni gravi	**N.**	19	33	15	21	1	0	3	1	0	0	5	2
	%	25,7%	49,3%	20,3%	28,8%	1,4%	0,0%	4,1%	1,4%	0,0%	0,0%	6,9%	2,7%

Lesioni al corpo

Il numero di soggetti con lesioni al corpo risulta piuttosto rilevante nel corso della prima osservazione, evidenziando percentuali minime superiori al 60% per tesi, con una media del 73%. Nelle successive rilevazioni il numero di casi osservati è stato molto più contenuto: rispettivamente il 6% (seconda rilevazione) e 8% (terza rilevazione) sul totale degli animali. L'analisi multivariata applicata ai dati delle lesioni alle orecchie non ha evidenziato effetti

significativi dell'interazione sesso x coda in nessuna delle tre rilevazioni.
Analogamente a quanto osservato per le lesioni alle orecchie, non si registrano effetti significativi del sesso e della presenza o meno della coda durante la prima e la seconda rilevazione (grafico 2). Nella terza rilevazione i maschi risultano meno a rischio di lesioni al corpo (3 vs 13%) rispetto alle femmine (OR=0,23, IC95%: 0,10-0,54). L'*odds ratio* associato alla presenza o meno della coda è al limite della significatività statistica.

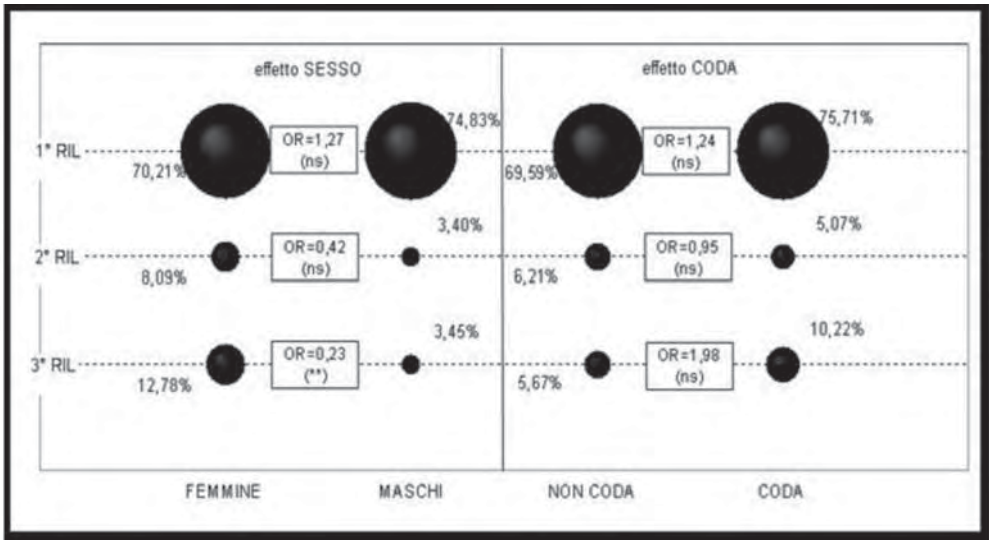


Grafico 2: sesso e presenza della coda come fattori di rischio di lesioni sul corpo in suinetti in svezzamento *(sex and tail presence as body lesions risk factors in weaners)*

(**=p-value < 0,01; ***=p-value < 0,005)

Considerando la gravità delle lesioni osservate sul corpo non si sono registrati casi gravi (score 2) in corrispondenza della seconda e terza rilevazione, mentre al primo controllo la percentuale di casi variava dal 28% per le femmine senza coda al 36% per le femmine con coda (tabella 2).

Tabella 2: casi di lesioni gravi al corpo in numero assoluto e percentuale alla prima rilevazione *(absolute and percent values of severe body lesions cases in the first survey)*

Rilevazione		**T_5**			
Sesso		**Femmine**		**Maschi**	
Coda		**No**	**Sì**	**No**	**Sì**
N. capi		74	67	74	73
Lesioni gravi	**N.**	21	24	22	24
	%	28,4%	35,8%	29,7%	32,9%

Lesioni alla coda

Come per le osservazioni effettuate sulle orecchie e sul corpo, anche per le lesioni alla coda non si evidenziano differenze statisticamente significative nei diversi gruppi (maschi/femmine e coda/non coda) alla prima rilevazione (grafico 3). Nella seconda rilevazione è maggiormente evidente l'effetto della presenza della coda; la probabilità di lesioni è 4 volte maggiore nei soggetti con coda rispetto ai soggetti senza coda (IC95%: 1,52-9,26). Alla terza rilevazione i maschi presentano un rischio 18 volte superiore rispetto alle femmine di lesioni alla coda (IC95%: 4,19-78,63), mentre l'OR associato al rischio di lesioni in presenza della coda risulta pari a 468 (IC95%: 99,69-2202,56). Entrambi gli *odds* risultano significativi. Un OR così elevato è sinonimo di uno sbilanciamento evidente del numero di casi verso i soggetti esposti rispetto ai non esposti: in effetti su un totale di 81 casi di lesioni, 80 hanno interessato i soggetti con coda. L'interazione sesso x coda non risulta significativa per nessuna rilevazione.

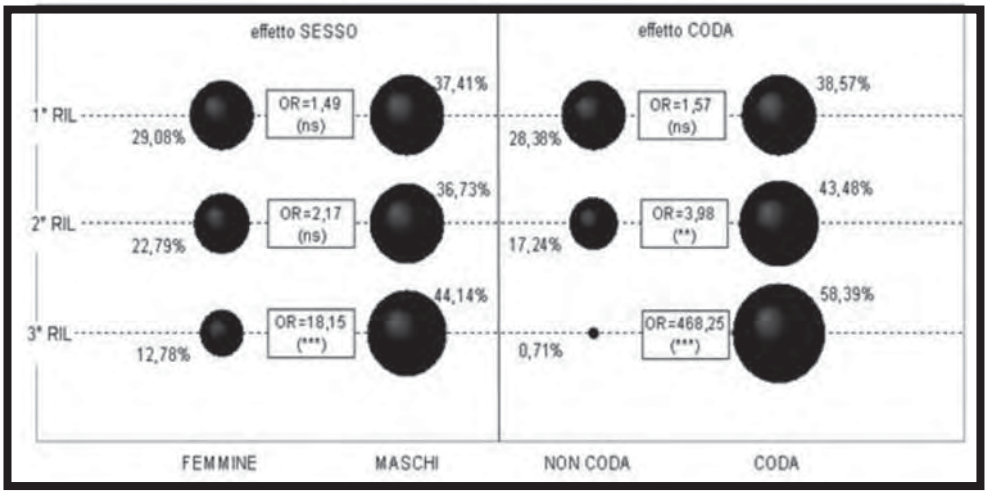


Grafico 3: sesso e presenza della coda come fattori di rischio per la morsicatura della coda in suinetti in svezzamento *(sex and tail presence as tail biting risk factors in weaners)*

(**=p-value < 0,01; ***=p-value < 0,005)

I casi di lesioni grave con score 2 risultano maggiormente concentrati nell'ultima rilevazione e tutti associati a soggetti maschi con coda (tabella 3).

Tabella 3: casi di lesioni gravi alla coda in numero assoluto e percentuale nelle tre rilevazioni *(absolute and percent values of severe tail lesions cases in the 3 surveys)*

Rilevazione		**T_5**				**T_{26}**				**T_{47}**			
Sesso		**Femmine**		**Maschi**		**Femmine**		**Maschi**		**Femmine**		**Maschi**	
Coda		**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**	**No**	**Sì**
N. capi		74	67	74	73	71	65	74	73	69	64	72	73
Lesioni gravi	**N.**	3	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	24
	%	4,1%	1,5%	2,7%	1,4%	0,0%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	32,9%

TIM

La valutazione del TIM è stata effettuata in corrispondenza della seconda e terza rilevazione. La percentuale di casi di TIM è più elevata nei maschi rispetto alle femmine sia alla seconda (46 vs 32%), che alla terza rilevazione (45 vs 38%), come evidenziato nel grafico 4. Tali differenze, riassunte attraverso l'OR, non risultano comunque statisticamente significative.
Per quanto riguarda l'effetto coda, il rischio di presenza di segni di TIM è maggiormente evidente nell'ultima rilevazione: i soggetti con coda hanno una probabilità di manifestare questo comportamento circa 4 volte superiore rispetto ai soggetti senza coda (IC95%: 1,42-11,34). L'interazione sesso/coda non risulta significativa.

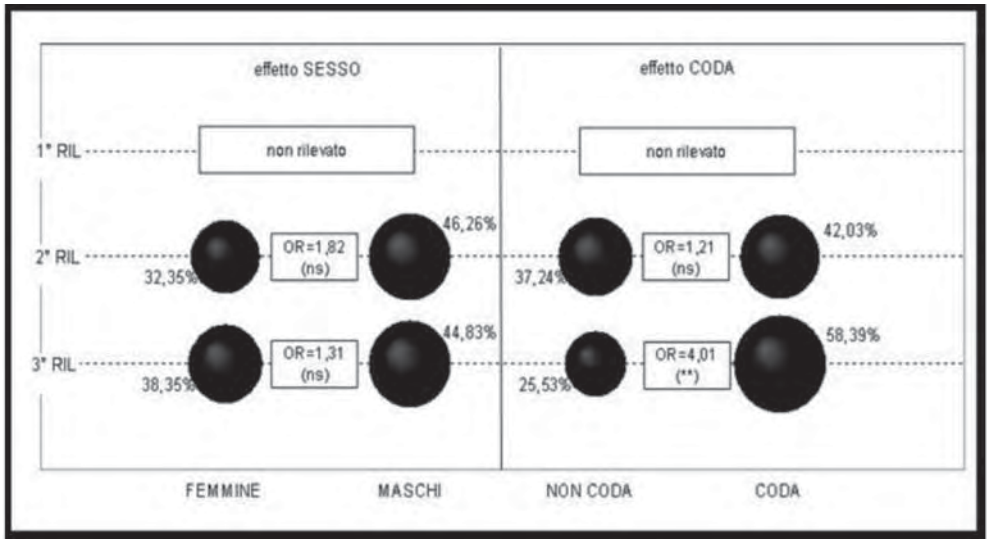


Grafico 4: Sesso e presenza della coda come fattori di rischio per il comportamento di TIM in suinetti in svezzamento *(sex and tail presence as TIM risk factors in weaners)*

(**=p-value < 0.01; ***=p-value < 0.005)

DISCUSSIONE

Dai dati della presente ricerca emerge chiaramente come i segni dell'aggressività, soprattutto per quanto riguarda le lesioni alle orecchie e al corpo, siano stati molto più marcati alla prima osservazione. Questo fenomeno può essere considerato la conseguenza della creazione delle gerarchie dopo il rimescolamento delle nidiate. Infatti in particolare le lesioni al corpo e alle orecchie hanno subito una drastica riduzione nelle successive osservazioni in seguito alla stabilizzazione sociale dei gruppi. Il sesso è sicuramente un fattore importante durante lo svezzamento nel determinare fenomeni di aggressività, nelle femmine infatti soprattutto nella fase conclusiva il rischio di morsicatura alle orecchie e alla coda è più basso. Quest'ultimo risultato è in accordo con quanto riportato da Penny et al. (1981), che rilevano un più alto livello di *tail biting* in gruppi unisessuali di maschi interi rispetto a gruppi unisessuali femminili. Nelle femmine rispetto ai maschi castrati è tuttavia maggiore il rischio di osservare lesioni a livello del corpo, soprattutto nella fase conclusiva dello svezzamento.

Se si considera invece la coda, la sua presenza risulta un chiaro fattore di protezione nei confronti della morsicatura alle orecchie. Queste ultime rappresentano infatti uno "stimolo" alternativo alla coda di cui i soggetti caudectomizzati possono fruire in misura minore per la presenza del solo moncone caudale. L'aggressività nei suini si indirizza prevalentemente verso le parti "sporgenti" del corpo, in quanto risultano le più facilmente raggiungibili durante i conflitti. Questa osservazione trova conferma nel fatto che l'incidenza delle lesioni al corpo non sembra essere condizionata in modo statisticamente significativo dalla presenza della coda.
Rilevanti sono i segni di morsicatura grave alla coda soprattutto nei maschi non caudectomizzati osservati alla terza rilevazione, a 71 giorni di età. Questo risultato sembra indicare una manifestazione precoce di *tail biting*, dato che la maggior parte degli studi colloca il periodo più critico tra i 90 e i 150 giorni di vita degli animali e quindi durante la fase di ingrasso (Aalund, 1978; Haske et al., 1979; Sambraus, 1985; Olsson e Hederstrøm, 1989; Schrøder-Petersen e Simonsen, 2001).
Tali valori sono confrontabili con quelli riportati da Candotti et al. (2009), che hanno rilevato percentuali di lesioni del 49% a 75 giorni di vita in soggetti con coda e senza arricchimenti, contro il 2,6% in soggetti caudectomizzati.
Per quanto riguarda i segni del TIM non si riscontra la significatività dell'effetto sesso osservata da Schrøder-Petersen et al. (2003). La presenza della coda lunga stimola il TIM ma la caudectomizzazione non preclude completamente la possibilità ai suini di manifestare questo comportamento, pur dimezzandone la frequenza.

CONCLUSIONI

L'assenza di interazioni significative tra fattore sesso e fattore coda porta a concludere che la presenza della coda impone il medesimo livello di attenzione sia per le femmine che per i maschi. Questi ultimi focalizzano il comportamento aggressivo maggiormente sulla coda e le orecchie, mentre le femmine lo rivolgono anche verso il corpo.
La presenza della coda rappresenta un fattore di protezione nei confronti delle orecchie, indicando quindi che la caudectomia non riduce l'aggressività dei suini in svezzamento, ma piuttosto la indirizza verso altre parti anatomiche.
I risultati di questo lavoro fanno parte di un progetto di ricerca che proseguirà per tutto il periodo produttivo fino alla macellazione dei gruppi. I dati rilevati nel corso di questa fase sperimentale richiedono ulteriori approfondimenti, che dovranno tenere necessariamente in considerazione gli effetti della densità di allevamento e della presenza di arricchimenti ambientali, calati nel contesto produttivo del suino pesante italiano.

Bibliografia

Aalund O. (1978) "Tail-biting, a stress indicator". *Dansk Veterinaertidsskrift* 1, 431-435.
Blackshaw J.K. (1981) "Environmental effects on lying behaviour and use of trough space in weaned pigs". *Appl. Anim. Ethol* 7, 281-286.
Bracke M., (2007) "Tail biting, ear biting and cannibalism" in: Geers R. "On farm monitoring of pig welfare" 1a ed., The Netherlands,Velarde e Geers eds., Wageningen Academic Publishers, 57-63.
Breuer K., Sutcliffe M.E.M., Mercer J.T., Rance K.A., Beattie V.E., Sneddon I.A., Edwards S.A. (2003) "The effect of breed on the expression of adverse social behaviour in pigs". *Appl. Anim. Behav.Sci*.84, 59-74.

Candotti P., Guizzardi F., Rota Nodari S., Guerzoni S., Turci S., (2009) "Somministrazione di paglia mediante dispenser in suini a coda lunga e a coda corta: valutazione del cannibalismo della coda e delle orecchie." In: "Atti della società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini". XXXV Meeting annuale, Modena 12-13 marzo 2009, 350-359.
D.Lgs. 20 febbraio 2004 n.53.
European Food Safety Authority (2007) "Scientific Report on the risk associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need to tail docking considering the different housing and husbandry systems". *The EFSA Journal* 611, 4-13.
Haske C., Bogner H., Peschke W. (1979) "Investigations on the behaviour for fattening pigs in different stall-housing systems in relation to tail and ear biting". *Bayerische Landwirtschaftliches Jahrbruch* 56, 162-200.
Olsson A.C., Hederstrøm K. (1989) "Some observations about tail biting among slaughter pig". *Specialmeddelande – Institutionen for Lantbrukets Byggnadsteknik, Sveriges Lantbruksuniversitet*.
Penny R.H.C., Walters S.J., Tredget S.J. (1981) "Tail-biting in pigs: a sex frequency between boars and gilts". *Vet. Rec.* 108, 35.
Sambraus H.H. (1985) "Mouth-based anomalous syndromes. Ethology of farm animals". *World animal science, Section A* 5,. 391-472.
Schrøder-Petersen D.L., Simonsen H.B. (2001) "Tail biting in pigs". *Vet. J.* 162, 196-210.
Schrøder-Petersen D., Schrøder-Petersen D.L., Simonsen H.B., Lawson L.G. (2003) "Tail-in-mouth behaviour among weaner pigs in relation to age, gender and group composition regarding gender". *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science* 53, 29-34.
Simonsen H.B., Klinken L., Bindseil E. (1991) "Histopathology of intact and docked pigtails". *Brit.Vet.J.* 147, 407-412.
Treuthardt S. (2001) "Neurome nach Schwanzkupieren beim Schwein". *Diss. med. vet. Zürich*.
Turner S.P., Farnworth M.J., White I.M.S., Brotherstone S., Mendl M., Knap P., Penny P., Lawrence A.B. (2006) "The accumulation of skin lesions and their use as a predictor of individual aggressiveness in pigs". *Applied Animal Behaviour Science* 96, 245–259.
Van de Weerd H.A., Docking C.M., Day J.E.L., Edwards S.A. (2005) "The development of harmful social behaviour in pigs with intact tails and different enrichment backgrounds in two housing systems". *Anim. Sci.* 80, 289-298.
Widowsky T.M., Cottrell T., Dewey C.E., et al. (2003) "Observations of piglet-directed behavior patterns and skin lesions in eleven commercial swine herds." *J Swine Health Prod.*11, 181-185.
Zonderland J.J., Fillerup M., Van Reenen C.G., Hopster H., Spoolder H.A.M. (2003) "Preventie en behandeling van staartbijten bij gespeende biggen". *RIAH report 18. Praktijkonderzoek*, Lelystad, The Netherlands.

Boehringer Ingelheim

FLEX

Efficacia senza compromessi

UTILIZZO DI TILMICOSINA (PULMOTIL™) NEL MANGIME PRESTARTER: ESPERIENZE PRATICHE

TILMICOSIN (PULMOTIL™) USE IN THE PRESTARTER FEED: FIELD EXPERIENCES

FERRO P.[1], MANDELLI C.[2], DE PAZ X.[3]

[1,3]Elanco Animal Health, *div. di Eli Lilly, Sesto Fiorentino (FI);* [2] *G.I.Ma. S.p.A., Rubiera (RE)*

Parole chiave: Malattia Respiratoria Suina, Tilmicosina, Suini di Pieno Valore™
Key words: Swine Respiratory Disease, Tilmicosin, Full Value Pigs™

Riassunto: Vengono riportate due esperienze pratiche relative all'utilizzo di tilmicosina (Pulmotil™) nel mangime prestarter. Nei siti II di due allevamenti "multi site", uno localizzato nel nord Italia e l'altro in Spagna nella provincia di Lleida, dopo conferma di malattia respiratoria, l'utilizzo di tilmicosina (Pulmotil™) è stato confrontato con altri due programmi terapeutici di medicazione nel mangime. Il periodo di trattamento è stato lo stesso (21 giorni dopo lo svezzamento) per entrambi i gruppi messi a confronto nelle due esperienze riportate. Nell'esperienza spagnola i suini di entrambi i gruppi sono stati vaccinati per Circovirus (PCV-II) (CircoFLEX™ - Boehringer Ingelheim™) a tre settimane d'età. Sono state poi valutate le performance sanitarie e zootecniche per tutto il periodo di permanenza nel settore post-svezzamento. In entrambe le esperienze i suini del Gruppo Pulmotil™ hanno fatto registrare accrescimenti significativamente migliori rispetto agli animali del Gruppo Controllo. Gli autori concludono rilevando come, in questo studio, l'utilizzo di Pulmotil™ abbia migliorato lo stato sanitario, con migliori performance nel periodo post-svezzamento.

Abstract: Two practical experiences about the tilmicosin (Pulmotil™) use in the prestarter feed are reported in this study. In the site II of two multi site commercial farms, located one in the north of Italy and the other in Spain (Lleida), after confirmation of respiratory disease, the use of tilmicosin (Pulmotil™) was compared with two other in feed medication therapeutic programs. The treatment period was the same (21 days after weaning) for both the compared groups in both experiences. In the Spanish experience all the piglets of both groups were vaccinated against Circovirus (PCV-II) (CircoFLEX™ - Boehringer Ingelheim™) at three weeks of age. The sanitary and zootechnical performances during the nursery period were evaluated. In both the experiences the pigs of the Pulmotil™ Group showed weight performances significantly better than the Control Group. In conclusion the authors point out as the use of Pulmotil™, in this study, increased animal health, with better performances in nursery.

INTRODUZIONE

Vari studi hanno dimostrato come la prevalenza iniziale di patogeni abbia un ruolo fondamentale nella gravità delle malattie e come interventi precoci possano ridurre questa prevalenza(1). Altri studi hanno valutato l'importanza del peso vivo alla fine del periodo post-svezzamento e calcolato che ogni kg in meno in uscita da questo settore si traduce in almeno sette giorni aggiuntivi di permanenza all'ingrasso necessari per raggiungere il peso di macellazione(2) causando quindi la diminuzione del numero di Suini di Pieno Valore™ che arrivano al macello. L'obiettivo del presente studio era valutare l'effetto della tilmicosina

Elanco™ (Pulmotil™) somministrata nel mangime prestarter nel controllo della malattia respiratoria nel settore post-svezzamento. Vengono riportate due esperienze pratiche.

MATERIALI E METODI

1° Esperienza: condotta nel sito II (settore post-svezzamento) di un allevamento commerciale "multi site" situato nel nord Italia. Dopo la conferma di malattia respiratoria due gruppi di circa 170 suini / gruppo sono stati valutati dallo svezzamento (età: 21 giorni) fino alla fine del periodo post-svezzamento (età: 67 giorni). Cinquanta suini per gruppo sono stati singolarmente individuati (tramite marca auricolare, foto 1) e pesati allo svezzamento (foto 2) e alla fine del periodo post-svezzamento. I due gruppi sottoposti alla prova sono stati individuati in base alla medicazione inclusa nel mangime pre-starter:

- ✓ Gruppo Pulmotil™: Tilmicosina (Pulmotil™) 400 ppm,
- ✓ Gruppo Controllo +: Sulfadimetossina 1400 ppm + clortetraciclina 560 ppm (Polisulfan™).

Foto 1. Suino individuato con marca auricolare.
Photo 1. Individually ear tagged pig.

Foto 2. Suino pesato singolarmente.
Photo 2. Individually weighed pig.

Il periodo di trattamento è stato lo stesso (21 giorni dopo lo svezzamento) per entrambi i gruppi.
I parametri controllati e registrati sono stati i seguenti:

- ➢ Numero di suini / gruppo,
- ➢ Peso medio (kg) allo svezzamento,
- ➢ Peso medio (kg) allo svezzamento dei suini pesati singolarmente,
- ➢ Numero di suini morti / gruppo,
- ➢ Numero di scarti / gruppo,
- ➢ Peso medio (kg) alla fine del periodo post-svezzamento,
- ➢ Peso medio (kg) alla fine del periodo post-svezzamento dei suini pesati singolarmente,
- ➢ Accrescimento Medio Giornaliero (AMG; gr / giorno).

Analisi Statistica: i pesi individuali sono stati confrontati tra i gruppi con analisi Anova a una via quando il test di Barlett dimostrava l'omogeneità della varianza e con test di Kruskal-

Wallis quando l'omogeneità della varianza non era dimostrata, utilizzando il software Intercooled Stata 7.0. Il livello di significatività considerato è stato p=0.01.

2° Esperienza: condotta nel sito II (settore post-svezzamento) di un allevamento commerciale "multi site" situato in Spagna nella provincia di Lleida. Dopo la conferma di malattia respiratoria due gruppi di circa 700 suini / gruppo sono stati valutati dallo svezzamento (età: 21 giorni) fino alla fine del periodo post-svezzamento (età: 58 giorni). Nel sito II oggetto dello studio arrivavano circa 700 suini a settimana (provenienza unica).
I due gruppi sottoposti alla prova appartenevano a due repliche settimanali consecutive e sono stati individuati in base alla medicazione inclusa nel mangime pre-starter:

- ✓ Gruppo Pulmotil™: Tilmicosina 400 ppm + Colistina 120 ppm + ZnO 2500 ppm,
- ✓ Gruppo Controllo +: Amoxicillina 300 ppm + Colistina 120 ppm + ZnO 2500 ppm.

In Tabella 1 viene riportato il numero degli animali sottoposti alla prova divisi per trattamento e replica.

Tabella 1. Numero di animali diviso per trattamento e replica.
Table 1. Number of animals in the study per treatment and replica.

	Replica		
Trattamento	1	2	Totale
Controllo	351	370	721
Pulmotil™	350	369	719
Totale	701	739	1440

Tutti i suini sottoposti alla prova sono stati vaccinati per Circovirus (PCV-II) (CircoFLEX™ - Boehringer Ingelheim™) a tre settimane d'età e non sono stati vaccinati per Mycoplasma hyopneumoniae.
Il periodo di trattamento è stato lo stesso (21 giorni dopo lo svezzamento) per entrambi i gruppi.
Tutti i suini sottoposti alla prova sono stati pesati singolarmente in tre momenti:

- ✓ Allo svezzamento (giorno 0, 21 giorni d'età),
- ✓ Alla fine del periodo di medicazione nel mangime prestarter (giorno 20, 42 giorni d'età),
- ✓ All'uscita dal settore post-svezzamento (giorno 37, 58 giorni d'età).

I parametri controllati e registrati sono stati i seguenti:

- ➢ Numero di suini / gruppo,
- ➢ Peso medio (kg) allo svezzamento (21 giorni d'età),
- ➢ Peso medio (kg) alla fine del periodo di medicazione nel mangime prestarter (42 giorni d'età),

- Peso medio (kg) all'uscita dal settore post-svezzamento (58 giorni d'età),

- Percentuale di morti / gruppo,
- Percentuale di scarti / gruppo
- Accrescimento Medio Giornaliero (AMG; gr / giorno).

Analisi statistica: La variabilità dei pesi (ai giorni 0, 20 e 37) e l'accrescimento medio giornaliero (negli intervalli di giorni 0-20, 20-37 e 0-37) sono stati analizzati considerando la varianza; tale variabilità è stata valutata tramite Anova F test.
Gli animali sono stati classificati posizionandoli in uno dei quattro quartili considerati (tabella 2).
Il livello di significatività considerato è stato p=0.05.

Tabella 2. Parametri di peso (kg) per la definizione della categoria di appartenenza.
Table 2. Cutting weights (kg) defining the weight categories.

	Leggeri	Medi 1	Medi 2	Pesanti
Giorno 0	<4.65	4.65-5.36	5.37-6.32	>6.32
Giorno 20	<8.28	8.28-9.51	9.52-10.94	>10.94
Giorno 37	<13.36	13.36-15.40	15.41-17.52	>17.52

RISULTATI E DISCUSSIONE

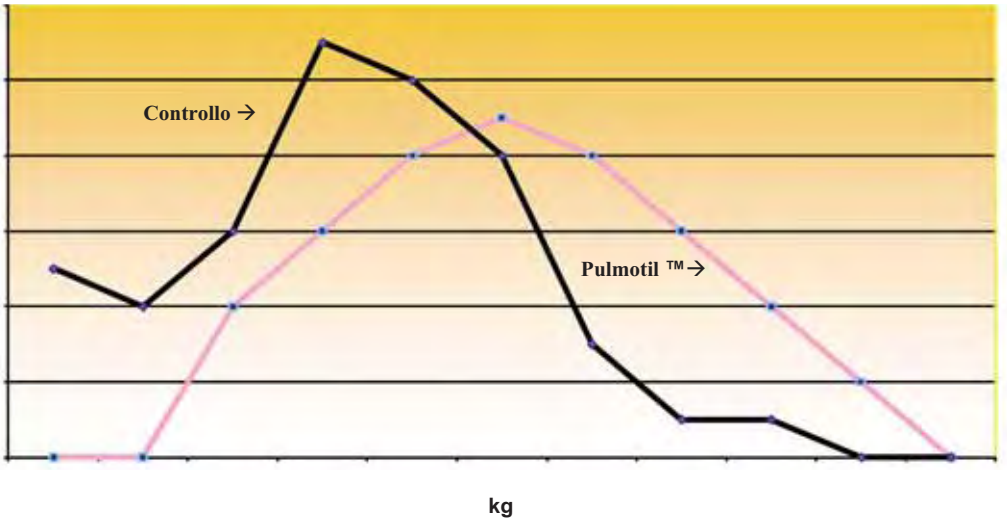
1° Esperienza: i risultati generali ottenuti sono riportati in tabella 3. Il numero di morti (1) e scarti (2) è risultato essere lo stesso per entrambi i gruppi. Il Gruppo Pulmotil™ ha evidenziato un peso medio alla fine del periodo post-svezzamento maggiore del Gruppo Controllo (29.15 kg vs 26.65 kg,). Il peso medio dei suini pesati individualmente alla fine del periodo post-svezzamento è risultato maggiore in maniera statisticamente significativa (Anova test $F_{1,60}$ p<0.01) nel Gruppo Pulmotil™ (29.48 kg vs 25.92kg, p<0.01, Tabella 3 e Grafico 1).

Tabella 3. Risultati.
Table 3. Results.

	Pulmotil™	Controllo	Differenza
Numero di suini	175	164	11
Giorni nel settore post-svezzamento	46	46	/
Peso medio (kg) allo svezzamento	7.47	7.58	- 0.11
Peso medio (kg) allo svezzamento dei suini pesati singolarmente	7.63	7.52	0.11
Peso medio (kg) alla fine del periodo post-svezzamento	29.15	26.65	2.50
Peso medio (kg) alla fine del periodo post- svezzamento dei suini pesati singolarmente	29.48*	25.92	3.57
AMG (gr/giorno)	470	410	70
Morti + Scarti (n)	3	3	/

*p < 0.01

Grafico 1. Distribuzione dei pesi dei suini pesati singolarmente alla fine del periodo post-svezzamento.
Graphic 1. Weight distribution of individually weighed pigs at the end of the nursery period.



2° Esperienza: La percentuale di morti + scarti è risultata essere del 2.99 % nel Gruppo Controllo e del 3.71 % nel Gruppo Pulmoti™, senza differenze statisticamente significative tra questi due parametri. Nella tabella 4 vengono riportati i pesi medi (kg) rilevati al giorno 0, al giorno 20 e al giorno 37 e gli accrescimenti medi giornalieri (AMG, g/d) calcolati. I pesi medi erano omogenei tra i due gruppi al giorno 0 (Gruppo Pulmotil™ 5.55 kg vs Gruppo Controllo 5.57 kg). Alla fine del periodo di medicazione (giorno 20) il peso medio dei suini del Gruppo Pulmotil™ è risultato maggiore in maniera statisticamente significativa di quello dei suini del Gruppo Controllo (9.76 kg vs 9.54; $p<0.05$), così come alla fine del periodo di prova (giorno 37) (15.81 kg vs 15.17; $p<0.05$). Anche gli AMG sono risultati significativamente più alti nel gruppo Pulmotil™ nei periodi 0-20 giorni (211 g/d vs 199 g/d; $p<0.05$), 20-37 giorni (355 g/d vs 331 g/d; $p<0.05$) e nel periodo totale di durata della prova, dal giorno 0 al giorno 37 (277 g/d vs 259 g/d; $p<0.05$).

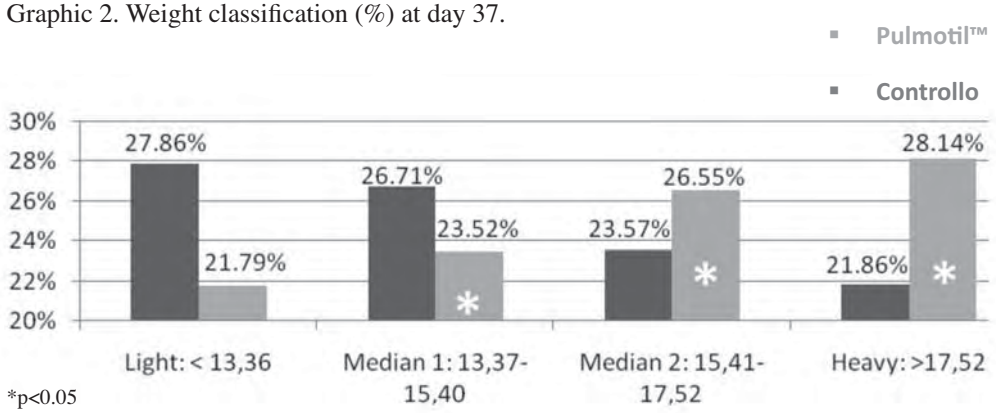
Tabella 4. Pesi medi e accrescimenti medi giornalieri (AMG) nei due gruppi.
Table 4. Weights and average daily gain (ADG) of the two groups.

	Trattamento			
	Controllo	**Pulmotil™**	Error st	Significatività
Peso al giorno 0 (kg)	5.57	5.55	0.0188	0.4901 (NS)
Peso al giorno 20 (kg)	9.54	9.76	0.0553	0.0044*
Peso al giorno 37 (kg)	15.17	15.81	0.0941	0.0001*
AMG 0-20 (g/d)	199	211	2.46	0.0004*
AMG 20-37 (g/d)	331	355	3.00	0.0001*
AMG 0-37 (g/d)	259	277	2.40	0.0001*

*p<0.05

Relativamente alla divisione dei suini di ciascun gruppo per quartili in base alla categoria di peso di appartenenza (leggeri, medi 1, medi 2, pesanti) al giorno 0 e al giorno 20 non sono state rilevate differenze statisticamente significative nell'evoluzione dei pesi, mentre alla fine del periodo di prova (giorno 37) sono state rilevate differenze statisticamente significative a favore del Gruppo Pulmoti™, con minor percentuale di suini classificati come Leggeri (Light, 21.79% vs 27.86%, $p<0.05$) e Medi 1 (Median 1, 23.53% vs 26.71, $p<0.05$) e maggiori percentuali di suini classificati come Medi 2 (Median 2, 26.55 vs 23.57, $p<0.05$) e pesanti (Heavy 28.14 vs 21.86, $p<0.05$), (Grafico 2).

Grafico 2. Classificazione dei pesi per categoria (%) al giorno 37.
Graphic 2. Weight classification (%) at day 37.



*p<0.05

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in entrambe queste esperienze pratiche confermano come Pulmotil™ possa migliorare lo stato sanitario, con conseguenti incrementi delle performance zootecniche dallo svezzamento alla fine del periodo post-svezzamento. Come riportato in altri studi[3], pesi più alti alla fine di questa fase possono favorire miglioramenti delle performance all'ingrasso e contribuire a massimizzare il numero di Suini di Pieno Valore™ al momento della macellazione.

BIBLIOGRAFIA

[1] Harker J.W. et al., 2006. The impact of Pulmotil feeding in the nursery on finishing performance of at-risk pigs. AASV proceedings, 127-130.

[2] Crenshaw J., 1998. Consequences of Limiting Feed Intake and Growth of Weanling Pigs. Feed facts, Jan 1998, 1-3.

[3] Ferro P. et al., 2008. Evaluation of two in feed medication therapeutic programs on attrition as consequence of swine respiratory disease in nursery. IPVS proceedings, 373.

IMPIEGO DI FONTI PROTEICHE ALTERNATIVE ALLA SOIA NELL'ALIMENTAZIONE DEL SUINO PESANTE

USE OF ALTERNATIVE PROTEIN SOURCES IN HEAVY PIG DIET

GIULIOTTI L.[1], SALVADORI G.[2], BENVENUTI M.N.[1], RUSSO C.[1], VENTURA A.[2], GATTA D.[1]

[1] Dipartimento di Produzioni Animali, Università di Pisa; [2] Medico Veterinario, Libero Professionista

Parole chiave: suino, pisello, favino, parametri produttivi, qualità della carne
Key words: pig, faba bean, pea, productive performance, meat quality

Riassunto

Scopo del presente studio è stato quello di valutare gli effetti dell'impiego di pisello e favino in sostituzione parziale della soia sulle performance zootecniche di suini all'ingrasso. La prova è stata condotta su 36 femmine divise in tre gruppi sperimentali, omogenei per età e peso; in un gruppo la fonte proteica era rappresentata dalla soia mentre negli altri due questa veniva parzialmente sostituita con il 20% di pisello e il 18% di favino. Periodicamente sono stati rilevati il consumo di mangime, il peso vivo, lo spessore del lardo dorsale, la larghezza della groppa e, dopo la macellazione, è stata analizzata la composizione chimica e acidica delle carni. Nessuno dei parametri produttivi è stato influenzato dalla dieta; l'unica differenza evidenziata ($P<0,01$) è stata a carico del contenuto in sostanza secca della carne che è stato più elevato nel gruppo alimentato con il pisello; nessuna differenza inoltre si è osservata nel profilo acidico delle carni dei tre gruppi. Questi risultati sembrano indicare che il pisello e il favino, nelle percentuali di sostituzione studiate, possono rappresentare valide fonti proteiche alternative alla soia.

Abstract

The aim of this study was to evaluate productive performances and some meat quality characteristics derived from heavy pigs fed pea or faba bean seeds as protein source in the diet.

The trial was carried out using 36 post-weaned female piglets divided into the three dietary treatments; one group received only soybean as protein source while the others received 20% of pea and 18% of faba bean in partial substitution of soybean. Data recorded were feed consumption, live weight, backfat depth, rump width, chemical composition and fatty acids profile of meat. The different diets did not affect any tested productive parameters. As regard chemical composition it seems that feed based on pea induced a higher and significant content in dry matter. The different feed fatty acid composition of the three diets has no effect on fatty acid profile of meat. Animal performances and meat characteristics did not seem to be influenced by the diet and therefore faba bean and pea, as partial substitutes of soybean, represent an interesting alternative protein sources in pigs' diet.

INTRODUZIONE

L'emergenza sanitaria legata all'utilizzo di proteine di origine animale in zootecnia ha portato alla necessità di reperire fonti proteiche vegetali da inserire nella formulazione delle razioni per gli animali in allevamento. Inoltre, la preoccupazione per l'ampia diffusione di semi di soia geneticamente modificati ha risvegliato l'interesse verso l'uso di fonti proteiche tradizionalmente non impiegate nell'alimentazione animale. In questo senso il favino (*Vicia faba L.* var. minor) e il pisello (*Pisum sativum*) possono costituire valide alternative alla soia sia in termini alimentari, grazie al loro valore nutritivo, contenendo il 26-35% di proteine (Grösjean *et al.,* 2001) ad alta solubilità e degradabilità (Alonso *et al*., 2000a; Alonso *et al*., 2000b; Alonso *et al*., 2001; Mariscal-Landin *et al*., 2002; Salgado *et al*., 2002; Berger *et al*., 2003; Prandini *et al*., 2005), che agronomici favorendo il recupero delle aree marginali, il mantenimento della fertilità del suolo e della biodiversità.
Tuttavia la presenza di fattori antinutrizionali quali tannini, lectine, inibitori di proteasi, alcaloidi (Gatel,1994) impone un'attenta valutazione della percentuale di sostituzione di queste leguminose nelle diete per evitare ripercussioni negative sui parametri produttivi e sulla salute degli animali. A questo scopo la presente ricerca ha cercato di valutare l'effetto di tre diete isoproteiche ed isoenergetiche formulate con tre diverse fonti proteiche (soia, favino e pisello) sulle performance zootecniche, sulle caratteristiche chimiche e sul profilo acidico della carne di suini pesanti.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta su 36 femmine (ibrido Pic x Goland) di circa tre mesi di età. Al loro arrivo in azienda i soggetti sono stati collocati in box adiacenti all'interno di uno stesso capannone, adibito ad uso esclusivo della sperimentazione, e sottoposti ad una fase di adattamento della durata di un mese. Successivamente i suini sono stati pesati e suddivisi in maniera *random* in tre gruppi sperimentali formati ciascuno da 12 soggetti omogenei per età (quattro mesi) e peso (55.8 kg ± 4.09).
Ai tre gruppi sono state assegnate diete, sotto forma di sfarinato, isoproteiche ed isoenergetiche che differivano per l'introduzione di diverse fonti proteiche (Tabella 1):
Gruppo "Soia": 100% farina di estrazione di soia;
Gruppo "Pisello": 20% pisello + 80% farina di estrazione di soia;
Gruppo "Favino": 18% favino + 82% farina di estrazione di soia;
Campioni di mangime sono stati sottoposti ad analisi chimica seguendo le metodiche suggerite da Martillotti *et al*. (1987), Van Soest *et al*.(1991), AOAC (2000), l'energia netta e quella digeribile sono state stimate rispettivamente secondo le equazioni di Morgan e Whittemore (1982) e di Noblet e Bourton (1997). La composizione acidica dei mangimi è stata valutata mediante estrazione dei lipidi utilizzando la procedura con cloroformio/ metanolo (2/1) secondo la metodica di Folch *et al*. (1957). Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati preparati come descritto da Morrison e Smith (1964) e sottoposti ad analisi gascromatografica su una colonna capillare ω-wax 0.32; lo schema utilizzato per l'analisi è stato il seguente: 160°C per i primi 7 minuti, aumentando di 3° C ogni minuto fino al raggiungimento della temperatura di 200° C, dove permane per 30 min. I risultati della analisi sono riportati in Tabella 2.

Tab. 1. Composizione delle tre diete.
Tab. 1. Composition of the three diets.

Ingredienti	*Dieta*		
	Soia	*Pisello*	*Favino*
Mais	58,00	53,00	48,00
Soia f.e. 44%	15,10	8,75	6,38
Favino	- -	- -	18,00
Pisello	- -	20,00	- -
Orzo	12,55	6,50	21,51
Crusca f.t.	10,00	8,00	2,50
Strutto	0,75	0,25	- -
Calcio carbonato	1,30	1,30	1,30
Fosfato bicalcico	1,10	1,10	1,10
Sale	0,30	0,30	0,30
Bicarbonato di sodio	0,20	0,20	0,20
Premix vitaminico	0,50	0,50	0,50
Magnesio ossido	0,10	0,10	0,10
Lisina	0,10	- -	0,05
Metionina	- -	0,05	0,06
	100,00	100,00	100,00

Tab. 2. Composizione chimica e profilo acidico delle tre diete (% S.S).
Tab. 2. Chemical composition and fatty acid profile of the three diets (% as fed).

	Dieta		
	Soia	*Pisello*	*Favino*
Sostanza secca	90,64	90,38	91,45
Proteine grezze	15,19	15,26	15,58
Lipidi grezzi	3,15	3,35	2,84
Fibra grezza	2,59	2,87	3,29
Estrattivi inazotati	74,86	74,20	74,12
Ceneri	4,21	4,32	4,17
NDF	13,82	14,34	16,05
ADF	4,48	4,31	5,18
Cellulosa	4,15	4,10	4,78
Emicellulosa	9,34	10,03	10,87
ADL	0,33	0,21	0,19
E.D (kcal/kg s.s.).	4.170	4.170	4.200
C14:0	0,00	0,00	1,10
C16:0	15,00	21,62	10,70
C16:1	0,25	0,34	0,21
C18:0	3,14	2,36	3,95
C18:1	20,12	11,82	23,60
C18:2	52,10	51,35	53,06
C18:3	8,90	11,82	7,06
C20:0	0,08	0,33	0,10
C20:1	0,23	0,34	0,21

Le diete sono state somministrate a partire da 1,7 kg/capo/d e mensilmente la razione è stata adeguata al fabbisogno teorico medio dei soggetti.
All'inizio, alla fine e in momenti intermedi della prova sono stati misurati i consumi alimentari e su ciascun soggetto sono stati rilevati il peso vivo, la larghezza della groppa misurata all'altezza della piega della grassella e lo spessore del lardo dorsale valutato tramite Renco Lean meter®, della Renco Corporation posto in posizione P2, previa rasatura delle setole.
Al termine della prova, all'età di circa nove mesi, i soggetti sono stati abbattuti presso un vicino impianto di macellazione.
Le analisi relative alla qualità della carne sono state condotte 24 ore dopo la macellazione su 30 campioni di muscolo *longissimus dorsi* isolato dalle mezzene destre (10 per tesi sperimentale). E' stata valutata la composizione chimica centesimale (AOAC, 1990) e quella acidica (Folch *et al*., 1957; Morrison and Smith, 1964).
Per la valutazione della variabilità relativa alle performance zootecniche è stata effettuata l'analisi statistica secondo un modello sperimentale per misure ripetute. L'analisi statistica relativa ai parametri qualitativi della carne è stata condotta mediante analisi della varianza utilizzando il software JMP vers. 5.0. per PC, del S.A.S. Institute (2002).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le performance zootecniche, seppure accettabili, non sono risultate ottimali nei tre gruppi considerati probabilmente a causa delle basse temperature ambientali, scese a livelli decisamente inferiori a quelli di neutralità termica nel periodo centrale della prova e aggravate anche dalla scarsa densità dei soggetti nel capannone.
I pesi registrati nei tre gruppi sperimentali sono apparsi pressoché simili nel corso della prova; i pesi finali, pari a 145, 153 e 152 kg rispettivamente per i suini del gruppo "Soia", "Pisello" e "Favino", sono risultati inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura da diversi Autori (Scipioni e Martelli, 2001; Trombetta, 2004; Bonomi, 2005; Schiavon *et al.,* 2007).
Anche gli incrementi ponderali giornalieri non hanno fatto emergere differenze significative fra i tre gruppi sperimentali e sono apparsi piuttosto contenuti (Tabella 3). Nella fase finale della sperimentazione si può osservare una leggera ripresa di questi parametri, soprattutto nel gruppo alimentato con pisello, che si avvicinano a quelli riportati da altri Autori (Prandini *et al*., 1995; Manini *et al*., 1997; Corino *et al*., 2008;).

Tab.3: Incrementi ponderali giornalieri (kg) nel corso della prova.
Tab. 3. Average daily gains (kg) during the trial.

	Dieta						
	Soia		*Pisello*		*Favino*		
Epoca del rilevamento (d)	media	*e.s.*	media	*e.s.*	media	*e.s.*	*P*
0 - 150	0,56	*0,02*	0,64	*0,02*	0,64	*0,03*	n.s.
0 - 55	0,60	*0,05*	0,60	*0,03*	0,60	*0,06*	n.s.
56 – 80	0,70	*0,04*	0,67	*0,04*	0,68	*0,03*	n.s.
81 - 125	0,55	*0,02*	0,66	*0,05*	0,66	*0,03*	n.s.
126 - 150	0,55	*0,10*	0,70	*0,07*	0,67	*0,07*	n.s.

La dieta non ha determinato differenze significative neppure per quanto riguarda l'indice di conversione; il valore medio complessivo è pari a 3,77 nei soggetti alimentati con favino, 3,83 in quelli riceventi pisello mentre il più sfavorevole (4,18) si osserva nel gruppo alimentato con soia.

Le informazioni riportate in bibliografia sullo spessore del lardo dorsale misurate mediante Renco Lean meter® (Tabella 4) risultano poco confrontabili (Ramaekers *et al*. 1996; Schiavon *et al*., 2007; Tagliapietra *et al*., 2008) in quanto riferiti a condizioni sperimentali diverse (tipo genetico, sesso, peso, età); i dati da noi rilevati sono apparsi simili nei tre gruppi e caratterizzati da una leggera flessione in corrispondenza del periodo compreso tra l'81° e il 125° giorno di prova.

Tab. 4. Spessore del lardo dorsale (cm) rilevato tramite Renco Lean Meter nel corso della prova.
Tab. 4. Backfat depth (cm) measured by Renco Lean Meter during the trial.

	Dieta						
	Soia		*Pisello*		*Favino*		
Epoca del rilevamento (d)	media	*e.s.*	media	*e.s.*	media	*e.s.*	*P*
0	0,75	*0,03*	0,83	*0,03*	0,79	*0,05*	n.s.
55	1,11	*0,04*	1,11	*0,04*	1,18	*0,05*	n.s.
80	1,25	*0,09*	1,22	*0,09*	1,33	*0,09*	n.s.
125	1,28	*0,12*	1,41	*0,14*	1,44	*0,12*	n.s.
150	1,37	*0,11*	1,61	*0,13*	1,58	*0,14*	n.s.

L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative per la larghezza della groppa (Tabella 5). Le misure di quest'ultima hanno subito una leggera flessione, concordemente a quanto riscontrato nella misura dello spessore del lardo dorsale e dei ridotti accrescimenti evidenziati.

Tab. 5. Larghezza della groppa (cm) nel corso della prova.
Tab. 5. Rump width (cm) during the trial.

	Dieta						
	Soia		*Pisello*		*Favino*		
Epoca del rilevamento (d)	media	*e.s.*	media	*e.s.*	media	*e.s.*	*P*
0	61,2	*0,62*	61,2	*0,50*	61,6	*0,80*	n.s.
55	69,0	*1,05*	71,0	*0,96*	70,1	*1,07*	n.s.
80	77,2	*1,06*	77,4	*1,41*	76,5	*1,52*	n.s.
125	77,8	*1,22*	78,5	*1,24*	79,1	*1,56*	n.s.
150	84,8	*1,29*	87,3	*1,47*	85,4	*1,19*	n.s.

Per quanto riguarda la composizione chimica della carne (Tabella 6) emerge come l'utilizzo del pisello proteico abbia indotto un significativo aumento del contenuto in sostanza secca, dovuta ad una percentuale maggiore di proteine ($p<0,01$). In generale, comunque, il contenuto in estratto etereo, che indica il livello di grasso delle carni, è risultato non superiore al 2% e quindi particolarmente ridotto: ciò, se da un lato può essere positivo per quanto riguarda l'aspetto dietetico, alla luce della sempre maggiore necessità per l'uomo di ridurre la quota energetica degli alimenti soprattutto se di origine animale, può penalizzare la carne dal punto di vista organolettico, poichè la quantità di grasso intramuscolare è collegata al sapore ed all'aroma (Wood, 1993); a tale proposito, Bejerholm & Barton-Gade (1996) suggeriscono, per le carni di maiale, un contenuto in grasso intramuscolare superiore al 2% per avere carni particolarmente gradite dal punto di vista sensoriale.

Tab. 6. Composizione chimica centesimale e profilo acidico (%) del muscolo *longissimus dorsi*.
Tab. 6. Chemical composition and fatty acid profile of longissimus dorsi muscle.

	Dieta						
	Soia		*Pisello*		Favino		
	media	*e.s.*	media	*e.s.*	media	*e.s.*	P
Sostanza secca	26,08	*0,35*	27,12	*0,25*	26,25	*0,22*	0,01
Proteine grezze	23,08	*0,13*	23,90	*0,14*	23,17	*0,13*	0,01
Estratto etereo	1,97	*0,21*	2,16	*0,22*	1,96	*0,20*	n.s
Ceneri	1,03	*0,05*	1,06	*0,05*	1,12	*0,04*	n.s
Acidi grassi saturi	44,55	*0,37*	44,94	*0,37*	44,74	*0,35*	n.s
Acidi grassi monoinsaturi	39,19	*0,44*	39,82	*0,44*	40,21	*0,42*	n.s
Acidi grassi poliinsaturi	13,31	*0,33*	13,66	*0,33*	13,35	*0,31*	n.s

E' possibile inoltre osservare che, sebbene i tre mangimi utilizzati differissero per quanto riguarda la composizione in acidi grassi (Tab.2), nessuna differenza significativa è stata riscontrata nel profilo acidico delle carni. I valori ottenuti sono comunque in linea con quanto riferito dalla letteratura (Alonso *et al*., 2009; Guillevic *et al*., 2009; Paiva-Martins *et al*., 2009).

CONCLUSIONI

Il favino ed il pisello utilizzati per suini all'ingrasso in parziale sostituzione della soia non hanno condizionato in maniera significativa le performance zootecniche, gli aspetti chimici e il profilo acidico delle carni per cui possono essere considerati valide alternative alla farina d'estrazione di soia in diete formulate per la produzione del suino pesante. Ciò risulta di grande interesse in quanto attualmente la soia, oltre a spuntare elevata volatilità dei prezzi sul mercato, può spesso derivare da piante geneticamente modificate che sono poco accettate dal consumatore. Inoltre l'utilizzo di fonti proteiche alternative può permettere di valorizzare le produzioni agronomiche locali e di caratterizzare la produzione suinicola, vincolandola maggiormente al territorio di origine.

RINGRAZIAMENTI: si ringrazia l'azienda "Torre a Cenaia" (Pi) per la fattiva collaborazione. Ricerca eseguita con Finanziamento Interateneo, Università di Pisa.

BIBLIOGRAFIA

Alonso R., Aguirre A., Marzo F. (2000a). "Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans". Food Chem. 68,159-165.

Alonso R., Grant G., Dewey P., Marzo F. (2000b). "Nutritional assessment *in vitro* and *in vivo* of raw and extruded peas (*Pisum sativum* L.)". J. Agr. Food Chem. 48, 2286-2290.

Alonso R., Rubio L.A., Muzquiz M., Marzo F. (2001)."The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals". Anim. Feed Sci. Technol. 94,1-13.

Alonso V., del Mar Campo M., Espanol S., Roncalés P., Beltràn J.A. (2009). "Effects of crossbreeding and gender on meat quality and fatty acid composition in pork". Meat Sci. 81, 209-217.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). "Official Methods of analysis. Meat and meat products". 39 (15th ed.) Washington, DC.

Berger J.D., Robertson L.D., Cocks P.S. (2003)."Agricultural potential of Mediterranean grain and forage legumes. 2. Anti-nutritional factor concentrations in the genus *Vicia*". Genet. Resour. Crop Ev. 50,201-212.

Bonomi A. (2005). "L'impiego dei semi di pisello espansi (*Pisum sativum L.*) nell'alimentazione dei suini all'ingrasso". Suinicoltura. 5, 81-86.

Bejerholm D.C, Barton-Gade P.A. (1996). "Effect of intramuscolar fat level on eating qualità of pig meat" Proc. of the 32nd Meeting of European Meat Research Workers, 24-29 August, Ghent, Belgium, 389-391.

Corino C., Musella M., Pastorelli G., Rossi R., Paolone K., Costanza L., Manchisi A., Maiorano G. (2008). "Influences of dietary coniugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs". Meat Sci. 79, 307-316.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". J. Biol. Chem. 226, 497-509.

Gatel, F. (1994). "Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review". Anim. Feed Sci. Technol. 45:317-348.

Guillevic M., Kouba M., Mourot J. (2009). "Effects of a linseed diet on lipid composition, lipid peroxidation and consumer evaluation of French fresh and cooked pork meats". Meat Sci. 81, 612-618.

Grösjean F., Cerneau P., Bourdillon A., Bastianelli D., Peyronnet C., Duc G. (2001). "Valeur alimentaire, pour le porc, de féveroles presque isogéniques contenant ou non des tanins et à forte ou faible teneur en vicine et convicine". J. Rech. Porcine en France 33: 205-210.

JMP, 2002. J.M.P. User's Guide ver. 5.0, S.A.S. Institute Inc. Ed. Cary (NC), USA.

Manini R., Piva A., Prandini A., Mordenti A., Piva G., Dourmad J.Y., (1997). "Protein retention in Italian heavy pigs: development of a factorial approach for determination of lysine requirement". Livest. Prod. Sci. 47, 253-259.

Mariscal-Landìn G., Lebreton Y., Sève B. (2002). "Apparent and standardised true ileal digestibility of protein and amino acids from faba bean, lupin and pea, provided as whole seeds, dehulled or extruded in pig diets". Anim. Feed Sci. Technol. 97,183-198.

Martillotti *et al*. (1987). "Metodi di analisi per la valutazione degli alimenti d'impiego zootecnico". Quaderni metodologici n. 8, IPRA – CNR ed., Roma, Italy.

Morgan & Whittemore (1982). "Energy evaluation of feeds and compounded diets for pigs – A review". Anim. Feed Sci. Technol. 7: 387-400.

Morrison W.R., Smith L.M. (1964). "Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol". J. Lipid Res. 5, 600-608.

Noblet J. & Bourdon D. (1997). "Valeur énergétique comparée de onze matières premières chez le porc en croissance et la truie adulte". Journées de la Recherche Porcine en France, 29, 221-226

Paiva-Martins F., Barbosa S., Pinheiro V., Mourao J.L. (2009). "The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances and quality of pork meat". Meat Sci. 82, 4, 438-443.

Prandini, A., Morlacchini M., Moschini M., Piva A., Fiorentini L., Piva G. (1995). "Performances de croissance et composition corporelle du porc lourd italien entre 80 et 160 kg de poids vif". Ann. Zootech. 45,75-87.

Prandini A., Morlacchini M., Moschini M., Fusconi G., Masoero F., Piva G. (2005). "Raw and extruded pea (*Pisum sativum*) and lupin (*Lupinus albus* var. *Multitalia*) seeds as

protein sources in weaned piglets' diets: effect on growth rate and blood parameter". Ital. J.Anim. Sci. 4, 385-394.
Ramaekers P.J.L., Swinkels J.W.G.M., Huiskes J.H., Verstegen M.W.A., Den Hartog L.A., Van der Peet-Schwering C.M.C. (1996). "Performance and carcass traits of individual pigs housed in groups as affected by ad libitum and restricted feeding". Livest. Prod. Sci. 47, 43-50.
Salgado P., Freire J.P.B., Mourato M., Cabral F., Toullec R.L J.P. (2002). "Comparative Effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes". Livest. Prod. Sci. 74,191-202.
Schiavon S., Gallo L., Carnier P., Tagliapietra F., Ceolin C., Prandini A., Piva A. (2007). "Use of simple body measurements and allometry to predict the chemical growth and feed intake in pigs". Ital. J. Anim. Sci. 6, 27-44.
Scipioni R., Martelli G. (2001). "Consequences of the use of ensiled sugar bett-pulp in the diet of heavy pigs on performances, carcass characteristics and nitrogen bilance: a review". Anim. Feed Sci. and Tecnology. 90, 81-91.
Tagliapietra F., Villani R., Cipolat C., Schiavon S., Bailoni L., Schiavon E., Merenda M. (2008). "L'utilizzo di soia cruda nell'alimentazione di suini allevati con il metodo biologico". Progetto "Piano Proteine Vegetali" - Azione 3. Regione Veneto.
Trombetta M.F. (2004). "Andamento del profilo metabolico in suini alimentati con diete diverse". Large Animal Review. 10, 2, 23-26.
Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). "Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition". J. Dairy Sci. 74:3583-3597.
Wood J.D., Richardson R.I., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E. (2003). "Effects of fatty acids on meat quality: a review". Meat Sci. 6, 21-32.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' AD ANTIMICROBICI DI *B. hyodysenteriae*: CONFRONTO TRA DUE METODI

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF B. hyodysenteriae: COMPARISON BETWEEN TWO METHODS

MAGISTRALI, C.F.[1], CUCCO, L.[1], D'AVINO, N. [1], D'ANGELO, G.[1], GHERPELLI, Y.[2], BONILAURI, P.[2], MERIALDI, G. [3]

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy; 2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Reggio Emilia; 3 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna, sezione di Bologna.

PAROLE CHIAVE: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, metodo, breakpoint
KEY WORDS: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae*, method, breakpoint

RIASSUNTO
Scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto due diversi metodi disponibili per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici di *Brachyspira hyodysenteriae*. Sono stati esaminati due differenti test per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC): il test di diluizione in agar (Quick-MIC) e il test di diluizione in brodo. 20 stipiti di *B.hyodysenteriae*, isolati da suini affetti da dissenteria suina in allevamenti italiani sono stati esaminati indipendentemente ed in cieco da due diversi laboratori diagnostici. I risultati hanno confermato quanto già descritto in letteratura: il metodo di diluizione in brodo tende a fornire MIC più basse in media rispetto al metodo di diluizione in agar. Utilizzando i breakpoint indicati da Ronne e Szancer (1990) alcuni ceppi classificati come intermedi con il metodo di diluizione in agar (Quick-MIC) sono risultati sensibili con il metodo di diluizione in brodo. Tuttavia, nessun isolato classificato come resistente in diluizione in agar è risultato sensibile in diluizione in brodo o viceversa. Concludendo, la classificazione di un isolato di *B.hyodysenteriae* può variare a seconda del metodo impiegato per la determinazione della MIC, in particolare per i ceppi che presentano un valore intermedio.

ABSTRACT
The aim of this study was to compare two different methods available for the evaluation of antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae*. Two different tests used for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) were compared: the Quick-MIC agar dilution method and the Broth dilution method. 20 *B. hyodysenteriae* strains, isolated from pigs affected by Swine Dysentery of Italian swine herds were tested blindly and independently by two different diagnostic laboratories. Results confirmed what already described in literature: the Broth dilution method give lower MICs compared to the agar dilution method (Quick MIC). According to the MIC breakpoints thresholds (Ronne & Szancer, 1990), some strains classified as intermediate by the agar dilution method (Quick MIC), resulted sensitive by the Broth Dilution method. Nevertheless, no isolate was classified resistant by agar dilution method (Quick MIC) resulted sensitive by the Broth Dilution Method or vice versa. In conclusion, classification of *B. hyodysenteriae* isolates in different susceptibility groups using the two tests can occur, in particular for those showing intermediate values.

INTRODUZIONE

Brachyspira hyodysenteriae è l'agente della dissenteria suina (SD), una patologia ben conosciuta, che tuttavia causa ancora notevoli danni economici negli allevamenti suini italiani. Il controllo della SD in allevamento è tradizionalmente legato all'impiego di antimicrobici, che sono utilizzati con successo anche in corso di programmi di eradicazione. Nel corso degli anni, sono stati consigliati diversi farmaci, tra i quali carbadox, dimetridazolo, tilosina, pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e lincomicina (Harris, 1999). Alcuni di questi antimicrobici sono stati però recentemente esclusi dall'impiego in zootecnia, a causa di potenziale effetto negativo per la salute umana, mentre altri sono stati progressivamente abbandonati per l'insorgenza di resistenze. Le pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) e la lincomicina sono quindi i più importanti composti per il trattamento delle infezioni da *B. hyodysenteriae*. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, sono state segnalate resistenze anche nei confronti di questi antibiotici, resistenze che hanno destato notevole preoccupazione tra gli operatori del settore (Grasham, 1998; Karlsson, 2002; Karlsson, 2004;). In questo contesto, la disponibilità di un test per la valutazione in vitro della sensibilità di *B. hyodysenteriae* agli antimicrobici appare rivestire un ruolo chiave.

Nonostante questo, non esistono metodi standardizzati per la valutazione dell'antibiotico-sensibilità del genere *Brachyspira*, poiché la normativa internazionale non raccomanda l'utilizzo del tradizionale antibiogramma, o Kirby-Bauer, per i batteri anaerobi (CLSI, ex NCCLS M11-A6,1 2004).

Il test maggiormente impiegato fino al 2002 si basava quindi su una valutazione della minima concentrazione inibente in diluizione in gel d'agar; a questo si è recentemente affiancato un metodo in brodo (Karlsson, 2002).

Scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a confronto le due metodiche, utilizzandole su di un pannello di 20 ceppi di *B. hyodysenteriae* isolati da suini affetti da SD in allevamenti italiani. I test sono stati effettuati in cieco da due diversi laboratori diagnostici.

MATERIALI E METODI

Isolati: venti ceppi di *B.hyodysenteriae* isolati da casi di dissenteria suina in allevamenti italiani sono stati utilizzati per lo studio. Gli isolati sono stati mantenuti in Microbank (Prolab Diagnostic, Richmond hill, Canada) a -80°C fino al momento dell'analisi. In seguito, i ceppi sono stati seminati in Agar sangue al 5% sangue di montone, e incubati in anaerobiosi a 42°C per 3-5 giorni. Dopo l'incubazione, la purezza del ceppo è stata verificata mediante microscopia ottica.

Metodo di diluizione in brodo: il metodo è stato effettuato sulla base di quanto già descritto da Rohde (2004). In breve, ciascun isolato è stato seminato su Anaerobe Fastidious Agar (LAB-M Ltd, UK) in anaerobiosi a 42°C per 72 ore. Dopo un controllo di purezza in microscopia, il ceppo è stato sospeso in BHI, ad una concentrazione di 10^8 ufc/ml circa. 300 μl della sospensione sono stati quindi aggiunti a 30 mL di BHI+ calf fetal serum (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) , fino ad ottenere una concentrazione di 10^6 ufc/ml circa. 0,5 ml di questa sospensione sono stati seminati in ciascun pozzetto di piastra VetMIC Brachy (SVA, Uppsala, Sweden) e incubati in anaerobiosi a 37°C per 4 giorni con agitazione continua. Un ceppo di *Brachyspira hyodysenteriae* (ATCC 27164, B78) è stato impiegato come controllo. Le concentrazioni testate sono state le seguenti: tiamulina: 0.063 μg/ml; 0,125 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; 8 μg/ml. Valnemulina: 0.031 μg/ml; 0.063 μg/ml; 0,125 μg/ml; 0.25 μg/ml; 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; Lincomicina: 0,5 μg/ml, 1 μg/ml; 2 μg/ml; 4 μg/ml; 8 μg/ml; 16 μg/ml; 32 μg/ml; 64 μg/ml. La lettura è avvenuta tramite visore ottico; La minima concentrazione inibente è stata definita sulla base della diluizione di antimicrobico più bassa in grado di inibire la crescita batterica.

Metodo di diluizione in agar (Quick MIC): è stato effettuato un metodo di diluizione in agar semplificato, utilizzando solo i valori di breakpoint per ciascun antibiotico, sulla base di quanto descritto da Ronne e Szancer (1990).
Le interpretazioni dei valori di MIC per entrambi i test sono state effettuate sulla base dei valori di Breakpoint riportati da Ronne e Szancer (1990) : Tiamulina: ≤ 1 μg/ml: sensibile; >1- ≤4 μg/ml: intermedio; >4 μg/ml: resistente. Valnemulina: ≤ 1 μg/ml: sensibile; >1- ≤4 μg/ml: intermedio; >4 μg/ml: resistente. Lincomicina: ≤ 4 μg/ml, sensibile; >4- ≤36 μg/ml: intermedio; >36 μg/ml: resistente.

RISULTATI
I risultati ottenuti sono indicati in tabella 1 e 2; per tiamulina 8 ceppi sono stati classificati come intermedi in diluizione in gel d'agar, e sensibili in metodo di diluizione in brodo: tutti questi ceppi mostravano valori di MIC superiori a 0,125 mcg/ml nel test di diluizione in brodo. Lo stesso risultato, vale a dire stipiti risultati come intermedi in diluizione in agar e sensibili in diluizione in brodo, si è verificata per 5 ceppi per valnemulina e 7 per lincomicina. Nessun ceppo classificato come sensibile da uno dei due metodi è stato giudicato come resistente dall'altro.

Tabella 1: Valori di MIC degli isolati di *B. hyodysenteriae* valutati mediante test di diffusione in agar (n=20)
Table 1: *MIC values of B. hyodysenteriae isolates by Agar Diffusion technique (n=20)*

	Valori di MIC (μg/ml) e interpretazione (S,I,R)				
Antibiotico	**<1 (S)**	**1-4 (I)**	**>4 (R)**	**4-36 (I)**	**>36 (R)**
Tiamulina	5	10	5		
Valnemulina	7	6	7		
Lincomicina				12	8

Tabella 2: valori di MIC degli isolate di *B. hyodysenteriae* valutati mediante test di diluizione in brodo (n=20). Le linee verticali indicano i valori soglia per intermedio e resistente. I ceppi resistenti sono indicati in grassetto.
Table 2: *MIC values of B. hyodysenteriae isolates by Broth Dilution Method (n=20). Vertical lines indicate MIC breakpoints thresholds. Resistant isolates are in bold.*

	Valori di MIC (μg/ml)											
Antibiotico	**0.031**	**0.063**	**0.125**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**
Tiamulina		1	2	5	2	3	1	1	**4**			
Valnemulina	2	1	2	1	4	1	3	**6**				
Lincomicina							1	6	2	3	1	**7**

DISCUSSIONE
La necessità di standardizzare i test per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici di *B. hyodysenteriae* è stata da più parte evocata, in particolare da quando il test di diluizione in brodo è stato descritto da Karlsson e collaboratori a partire dal 2001 (Karlsson, 2002). Non sono, infatti, disponibili circuiti interlaboratorio per questo genere batterico, e un ring test internazionale,

organizzato nel periodo 2002-2004, ha rilevato una forte variabilità inter-laboratorio, sia nelle metodiche per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici, che negli esiti forniti (Rasback, 2005). Il confronto tra i due test più importanti, quello di diffusione in agar e quello in brodo, è stato effettuato da alcuni autori: in generale, i lavori disponibili in letteratura concordano nel rilevare come le MIC fornite dal test in brodo si collochino su valori di 1-2 diluizioni più basse rispetto a quelle ottenute con il test in agar (Rasback, 2004; Rohde, 2004), come peraltro già indicato nella normativa di riferimento (NCCLS M11-A4). Queste differenze sono normalmente contenute a 1-2 fattori di diluizione, ma possono influenzare l'attribuzione di un ceppo alle diverse classi di sensibilità (Karlsson, 2002), per le quali si utilizzano i criteri d'interpretazione proposti da Ronne e Szancer nel 1990 (Ronne & Szancer, 1990).
Anche nel corso di questo lavoro, si è confermata la tendenza del test in brodo a fornire valori MIC mediamente più bassi rispetto al metodo in agar.
Nel nostro caso, nessun ceppo risultato sensibile con una metodica ha dato esito resistente con l'altra o viceversa, dimostrando una buona concordanza dei due test per ceppi chiaramente sensibili o resistenti; tuttavia, alcuni stipiti categorizzati come sensibili in diluizione in brodo sono stati valutati intermedi applicando il test in agar.

CONCLUSIONI

La buona concordanza dei due metodi per i ceppi chiaramente resistenti garantisce il rilievo di questi all'interno degli allevamenti esaminati. E' tuttavia importante, a nostro parere, nell'interpretazione del dato analitico, fare riferimento alla metodica impiegata contestualmente all'esito. Inoltre, congiuntamente alla categorizzazione del ceppo in sensibile, intermedio o resistente, è opportuno rilevare il valore quantitativo della MIC, poiché, nel caso della tiamulina, l'insorgenza di un'eventuale resistenza avviene in modo graduale (Karlsson, 2004).

BIBLIOGRAFIA

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 2004. "Method for Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria" sisith ed. Approved standards M11-A6. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Gresham A.C., Hunt B.W., Dalziel R.W. (1998) "Treatment of swine dysentery – problems of antibiotic resistance and concurrent salmonellosis ". Vet Rec 143, 619.

Harris D.L., Hampson D.J., Glock R.D. (1999) "Swine Dysentery". In: Straw B.E., D'Allaire A., Mengeling W.L., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 8th ed., Iowa State University Press. Ames, Iowa U.S.A., 579-600.

Karlsson M., Oxberry S.L., Hampson D.J. (2002) "Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method". Vet. Microbiol. 84, 123-133.

Karlsson M., Aspan A., Landen A., Franklin A. (2004) "Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with descreased susceptibility to tiamulin" Journal of Medical Microbiology. 53, 281-285.

Rasback T., Fellstrom C., Bersgjo B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S.M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M. (2005). "Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of Brachyspira species using a ring test". Vet. Microbiol. 109, 229-243.

Rohde J., Kessler M., Baums C.G., Amtsberg G. (2004) "Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany". Vet. Microbiol. 102, 25-32.

Ronne H., Szancer J. (1990) "In vitro susceptibility of Danish field isolates of Treponema hyodysenteriae to chemiotherapeutics". In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland, 126.

GLI EICOSANOIDI NELLE PNEUMOPATIE INFIAMMATORIE DEL SUINO

EICOSANOIDS IN PORCINE LUNG DISEASES

MARRUCHELLA G., GIACOMINELLI-STUFFLER R., MACCARRONE M.

Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro 45, 64100 – Teramo.

Parole chiave: leucotrieni, prostaglandine, 5-lipossigenasi, cicloossigenasi-2, polmoniti, suino
Key words: leukotrienes, prostaglandins, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2, pneumonia, swine

RIASSUNTO
Gli eicosanoidi derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e svolgono molteplici funzioni, ben oltre la nota proprietà di mediare alcuni eventi chiave dei processi flogistici. Si riportano i dati relativi all'espressione della 5-lipossigenasi (5-LOX) e della cicloossigenasi-2 (COX-2), ed alla conseguente produzione di leucotriene B4 (LTB_4) e di prostaglandine E2 (PGE_2), in corso di varie pneumopatie infiammatorie del suino, sostenute da agenti eziologici differenti e verosimilmente caratterizzate da meccanismi patogenetici specifici. Sono stati oggetto di studio campioni di parenchima polmonare prelevati da soggetti sani di controllo e da suini affetti dalle seguenti patologie: broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp., polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*, pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, polmonite interstiziale da *Porcine Circovirus type 2* (PCV-2). I risultati delle nostre indagini, condotte attraverso opportune tecniche immunoistochimiche e biochimiche, dimostrano che l'attività di 5-LOX e COX-2, nonché la sintesi di LTB_4 e PGE_2, si modificano in senso quali-quantitativo in corso di pneumopatie infiammatorie del suino. Ciò induce a ritenere che leucotrieni e prostaglandine possano contribuire significativamente alla patogenesi delle malattie infiammatorie del polmone.

ABSTRACT
Eicosanoids are products of the arachidonic acid metabolism and play a multitude of biologic actions, not only as chemical mediators of inflammation. We report herein data about 5-lipoxygenasae (5-LOX) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, as well as about leukotriene B4 (LTB_4) and prostaglandin E2 (PGE_2) synthesis in porcine inflammatory lung diseases, which are caused by different etiologic agents. Pulmonary tissue samples were collected from healthy controls and from pigs affected by parasitic bronchopneumonia (*Metastrongylus* spp.), enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*), pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), interstitial pneumonia (*Porcine Circovirus type 2*, PCV-2). Immunohistochemical and biochemical investigations showed that 5-LOX and COX-2 activities, as well as LTB_4 and PGE_2 synthesis, are significantly increased in porcine pneumonia, thus suggesting their likely involvement in the pathogenesis of porcine lung inflammatory diseases.

INTRODUZIONE
Le malattie respiratorie del suino sono solitamente il frutto di complesse interazioni che vengono a stabilirsi tra agenti patogeni e fattori ambientali. Per tale motivo, è attualmente in uso la definizione di "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine Respiratory*

Disease Complex, PRDC) per descrivere un insieme di pneumopatie, sostenute da agenti eziologici diversi, in grado di indurre manifestazioni cliniche e di compromettere le *performances* produttive degli animali. I meccanismi patogenetici coinvolti in corso di PRDC sono in buona parte ancora sconosciuti. Virus e batteri pneumotropi agiscono spesso in sinergismo e posseggono fattori di virulenza che permettono loro di resistere alle difese immunitarie dell'ospite e di causare alterazioni morfologiche e funzionali (Brockmeier *et al*., 2002).
Gli eicosanoidi sono metaboliti dell'acido arachidonico (AA) in grado di svolgere molteplici funzioni biologiche. Il metabolismo dell'AA può procedere lungo due vie enzimatiche principali. Le lipossigenasi (LOX) sono responsabili della produzione di leucotrieni (LT) e lipossine, mentre le cicloossigenasi (COX) sintetizzano prostaglandine (PG) e trombossani (Kumar *et al*., 2007).
Obiettivo della presente indagine è stato valutare il ruolo delle vie metaboliche 5-LOX e COX-2 dipendenti nella patogenesi di varie pneumopatie infiammatorie del suino, sostenute da agenti eziologici diversi e verosimilmente frutto di meccanismi patogenetici specifici.

MATERIALI E METODI

Sono stati oggetto di studio campioni parenchima polmonare prelevati da suini sani di controllo regolarmente macellati (n = 4) e da suini affetti dalle seguenti patologie respiratorie: broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp. (n = 4), polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae* (n = 4), pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (n = 4), polmonite interstiziale da *Porcine Circovirus type 2* (PCV-2, n = 4). In tutti i casi, la diagnosi eziologica è stata confermata mediante idonee indagini di laboratorio.
Aliquote di ciascun campione tessutale sono state fissate in formalina neutra tamponata al 10%, incluse in paraffina e destinate alle indagini istopatologiche ed immunoistochimiche. In particolare, l'immunoistochimica per 5-LOX e COX-2 è stata eseguita seguendo un protocollo già precedentemente pubblicato ed al quale si rimanda per ulteriori dettagli (Marruchella *et al*., in press).
I campioni destinati alle indagini biochimiche sono stati, invece, immediatamente congelati e stoccati a -80°C. L'espressione di 5-LOX e COX-2 è stata valutata mediante *Western Blotting* e specifici test di attività enzimatica, secondo quanto già riportato in letteratura (Marruchella *et al*., in press).
I metaboliti dell'AA (LTB_4 e PGE_2) sono stati quantificati utilizzando kit disponibili in commercio (Leukotriene B_4 EIA Kit™; Prostaglandin E2 EIA Kit™, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).
I risultati delle indagini biochimiche sono stati sottoposti ad analisi statistica (Mann-Whitney U test, InStat 3™ program , GraphPAD Software for Science, San Diego, California).

RISULTATI

Le indagini istopatologiche hanno confermato l'assenza di lesioni apprezzabili nei suini di controllo e, nel contempo, hanno permesso la caratterizzazione dettagliata delle diverse forme morbose oggetto di indagine.
Nei soggetti di controllo, le indagini immunoistochimiche hanno dimostrato una modesta espressione di 5-LOX e COX-2, per lo più circoscritta alle cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare. L'immunoreattività nei confronti di 5-LOX e COX-2 è, invece, risultata molto più intensa in tutte le pneumopatie oggetto di studio, coinvolgendo una vasta gamma di citotipi differenti (vedi Tabelle 1-2).

	Epitelio bronchiolare	Muscolatura liscia	Macrofagi	Granulociti neutrofili	Pneumociti	Endotelio	Mesotelio
Controllo	+	-	--	-	-	-	-
Broncopolmonite verminosa	++	+++	++	+	++	+	-
Polmonite enzootica	++	-	+++	+++	++	+	-
Pleuropolmonite	++	-	+	++	+	+++	-
Polmonite interstiziale	++	-	++	+	+	+	-

Tabella 1. Valutazione immunoistochimica dell'espressione della 5-LOX da parte di differenti tipi cellulari (= assenza di immunoreattività; + = immunoreattività modesta; ++ = intensa immunoreattività; +++ = immunoreattività estremamente marcata).

	Epitelio bronchiolare	Muscolatura liscia	Macrofagi	Granulociti neutrofili	Pneumociti	Endotelio	Mesotelio
CONTROLLO	+	-	--	-	-	-	-
Broncopolmonite verminosa	++	+	+	+	+	+	-
Polmonite enzootica	++++	-	+++	+++	+	++	-
Pleuropolmonite	+++	-	+++	+++	+	++	+++
Polmonite interstiziale	++	-	+++	+	++	+	-

Tabella 2. Valutazione immunoistochimica dell'espressione della COX-2 da parte di differenti tipi cellulari (= assenza di immunoreattività; + = immunoreattività modesta; ++ = intensa immunoreattività; +++ = immunoreattività estremamente marcata).

Il *Western Blotting* ha dimostrato l'espressione di 5-LOX e COX-2 in tutti i suini oggetto di studio. Tuttavia, il segnale immunobiochimico è risultato più intenso in corso di polmonite enzootica, pleuropolmonite e polmonite interstiziale da PCV-2. Anche l'attività enzimatica di 5-LOX e COX-2, nonché le concentrazioni di LTB_4 e PGE_2 sono risultate significativamente più elevate in corso di polmonite enzootica, pleuropolmonite e polmonite interstiziale da PCV-2.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli eicosanoidi sono mediatori chimici di natura lipidica in grado di mediare la maggior parte degli eventi che caratterizzano l'infiammazione acuta (Ackermann, 2007). I LT determinano vasodilatazione e broncocostrizione, svolgendo un ruolo rilevante nella patogenesi dell'asma bronchiale (Lewis *et al*., 1990; Peters-Golden and Henderson, 2007). Tuttavia, la sintesi di LT è dimostrabile – *in vivo* ed *in vitro* – in corso di infezioni sostenute da batteri (Hopkins *et al*., 1989; Coffey *et al*., 2004), virus (Hennet *et al*., 1992), funghi (Castro *et al*., 1993), protozoi (Locksley et al., 1985) e parassiti (Marruchella *et al*., in press). *In vivo*, i LT contribuiscono alle difese immunitarie innate sia direttamente, stimolando la chemiotassi dei leucociti (Ford-Hutchinson *et al*., 1980; Tager *et al*., 2003) e la fagocitosi (Coffey *et al*., 1998; Talvani *et al*., 2002), sia indirettamente inducendo la sintesi di altri mediatori (Peters-Golden *et al*., 2005). I risultati delle nostre indagini dimostrano che la via metabolica 5-LOX dipendente viene attivata in diverse patologie polmonari, pur diverse per eziologia, quadri lesivi macro/

microscopici e meccanismi patogenetici. Pertanto, 5-LOX e LTB_4 sono verosimilmente parte integrante delle difese dell'ospite nei confronti di parassiti, virus e batteri responsabili delle patologie respiratorie oggetto di studio. I dati qui presentati confermano, inoltre, che molti tipi cellulari sono in grado di esprimere livelli apprezzabili di 5-LOX, soprattutto in corso di pneumopatie infiammatorie. È interessante notare che l'espressione della 5-LOX è indotta in modo differente e "specifico" – dal punto di vista quali-quantitativo – a seconda dell'agente eziologico coinvolto e verosimilmente dei meccanismi patogenetici implicati.
Le PG sono prodotte da quasi tutte le cellule ed agiscono con meccanismo autocrino, paracrino ed endocrino, attraverso l'interazione con recettori specifici. L'espressione della COX-2 è fisiologicamente modesta o del tutto assente nella maggior parte dei tessuti. I lipopolisaccaridi batterici sono notoriamente in grado di indurre l'espressione della COX-2. Precedenti indagini hanno dimostrato il coinvolgimento della COX-2 nella patogenesi di alcune patologie respiratorie del suino ad eziologia batterica (Cho and Chae, 2002, 2003, 2004) e parassitaria (Marruchella *et al*., in press). Le nostre indagini hanno evidenziato che l'attività della COX-2 è esaltata in corso di patologie infiammatorie del polmone. I metaboliti della via metabolica COX-2 dipendente possono avere attività pro- od anti-infiammatoria; pertanto, non è semplice stabilire in che modo le PG possono intervenire nelle fasi di inizio, progressione e risoluzione del danno.
In conclusione, i risultati delle nostre indagini dimostrano che le vie enzimatiche 5-LOX e COX-2 dipendenti vengono esaltate entrambe nelle patologie infiammatorie del polmone e che gli eicosanoidi verosimilmente contribuiscono in modo significativo alla patogenesi delle stesse.

BIBLIOGRAFIA

Ackermann M.R. (2007) "Acute inflammation". In: "Pathologic Basis of Veterinary Disease", 4th Edit., McGavin M.D., Zachary J.F., Eds., Mosby Elsevier, USA pp. 101-152.
Brockmeier S.L., Halbur P.G., Thacker E.L. (2002) "Porcine respiratory disease complex". In: "Polymicrobial Diseases", Brodgen A., Guthmiller J.M., Eds, ASM Press, USA pp. 231-258.
Castro M., Morgenthaler T.I., Hoffman O.A., Standing J.E., Rohrbach M.S., Limper A.H. (1993) "Pneumocystis carinii induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 9, 73-81.
Cho W.S., Chae C. (2002) "Immunohistochemical detection of cyclooxygenase-2 in lungs of pigs naturally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". Journal of Comparative Pathology 127, 274-279.
Cho W.S., Chae C. (2003) "Expression of cyclooxygenase-2 in swine naturally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". Veterinary Pathology 40, 25-31.
Cho W.S., Chae C. (2004) "Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae". Veterinary Pathology 41, 666-672.
Coffey M.J., Phare S.M., George S., Peters-Golden M., Kazanjian P.H. (1998) "Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils". Journal of Clinical Investigation 102, 663-670.
Coffey M.J., Phare S.M., Peters-Golden M. (2004) "Role of leukotrienes in killing of Mycobacterium bovis by neutrophils". Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids 71, 185-190.
Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., Smith M.J. (1980) "Leukotriene

B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes". Nature 286, 264-265.
Hennet T., Ziltener H.J., Frei K., Peterhans E. (1992) "A kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus". Journal of Immunology 149, 932-939.
Hopkins H., Stull T., Von Essen S., Robbins R., Rennard, S. (1989) "Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia". Chest 95, 1021-1027.
Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N. (2007) "Acute and chronic inflammation". In: "Robbins Basic Pathology", 8th Edit., Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N., Eds., Saunders Elsevier, USA pp. 31-58.
Lewis R.A., Austen K.F., Soberman R.J. (1990) "Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease". New England Journal of Medicine 323, 645.
Locksley R.M., Fankhauser J., Henderson W.R. (1985) "Alteration of leukotriene release by macrophages ingesting Toxoplasma gondii". Proceedings of The National Academy of Sciences USA 82, 6922-6926.
Marruchella G., Giacominelli-Stuffler R., Baffoni M., Maccarrone M. "5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in porcine parasitic bronchopneumonia: Immunohistochemical and biochemical investigations". Journal of Comparative Pathology, in press.
Peters-Golden M., Canetti C., Mancuso P., Coffey M.J. (2005) "Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses". Journal of Immunology 174, 589-594.
Peters-Golden M., Henderson W.R. (2007) "Leukotrienes". New England Journal of Medicine 357, 1841-1854.
Tager A.M., Bromley S.K., Medoff B.D., Islam S.A., Bercury S.D., Friedrich E.B., Carafone A.D., Gerszten R.E., Luster A.D. (2003) "Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment". Nature Immunology 4, 982-90.
Talvani A., Machado F.S., Santana G.C., Klein A., Barcelos L., Silva J.S., Teixeira M.M. (2002) "Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection". Infection and Immunity 70, 4247-4253.

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

ANALISI DEI RITORNI NELLA SCROFA: STUDI PRELIMINARI

ANALYSIS OF SOW RETURNS: PRELIMINARY STUDIES

MAZZONI C.[1], TONON F[2]., BORRI E. [3], RAFFI V[4].; SCOLLO A[5].; BONILAURI P[6].

[1]Veterinario libero professionista Suivet (Reggio Emilia)

mazzoni.claudio@alice.it

[2]Veterinario libero professionista Suivet (Treviso)

[3]Veterinario specializzato in Patologia Suina, libero professionista Suivet (Reggio Emilia)

[4]Veterinario specializzato in Sanità Animale, libero professionista Suivet (Parma)

[5]Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Animali

[6]IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sez. diagnostica di Reggio Emilia.

Parole chiave: Ritorni irregolari, Mortalità embrionale, Aborti

Key words: Irregular returns, Embryo death, Abortion

Riassunto:

Il mantenimento e la prosecuzione della gravidanza nella scrofa, passano attraverso l'emissione, da parte dell'embrione, di un doppio segnale ormonale. La mancata produzione di tali segnali può permetterci di comprendere il motivo della variabilità dei ritorni in estro che, nella scrofa, possiamo raggruppare in tre classi: Ciclici di primo tipo (fra i 18 ed i 23 giorni), Aciclici (fra i 24 ed i 38 giorni) e Ciclici di secondo tipo (fra i 39 ed i 44 giorni).

Nel presente lavoro vengono analizzati i dati riproduttivi del 2008 e 2009 di due aziende della pianura padana, confrontando fra loro le varie classi di ritorno. Particolare attenzione viene riservata ai Ritorni Aciclici, divisi a loro volta in Aciclici di primo e secondo tipo, in base al passaggio dalla vita embrionale a quella fetale. Nei risultati si evidenzia una minore stabilità della gravidanza durante la fase embrionale in rapporto a quella fetale.

L'importanza di studiare e capire meglio questi meccanismi, potrebbe permetterci di trovare soluzioni efficaci per contenere la mortalità embrionale in una fase molto delicata della gestazione, soprattutto da quando, a seguito dell'applicazione della norma per la protezione dei suini, corre la necessità di imbrancare tanto le scrofe, quanto le scrofette, alla quarta settimana di gestazione.

Abstract:

The maintenance and persistence in sow pregnancy, go through the production by the embryo of two different hormonal signals. Failure to produce these signals may allow us to understand the different classes of returns in estrus that, in sows can be divided into three category: Regular Returns of first type (between 18 and 23 days), Irregular Returns (between 24 and 38 days) and Regular Returns of second type (between 39 and 44 days).

The present paper analyse the reproductive data of 2008 and 2009 of two Po Valley farms, by comparing together the various classes of return. Particular attention is given to Irregular Returns, divided in first and second type, according to the transition from embryonic to fetal stage. Results showed a less stability during the embryonic stage of pregnancy related to fetal stage.

The importance of studying and understanding these mechanisms could help in finding effective solutions to contain the embryonic mortality in a very sensitive stage of gestation, especially since due to the application of the law for pigs protection, running the necessity to herd together sows, gilts at the fourth week of gestation.

INTRODUZIONE:

Da sempre la parola, e di conseguenza il dialogo, sono alla base dell'equilibrio e della pace fra le singole persone ed i popoli. Tuttavia non sempre l'uomo è riuscito a sfruttare il dialogo nella maniera più corretta ed è così che spesso si sono innescati meccanismi che a "cascata" hanno spinto, e spingono ancora oggi, l'umanità a compiere azioni scellerate.

Eppure l'importanza del dialogo dovrebbe essere un concetto ben consolidato nella nostra natura. Sin dal momento del concepimento ogni embrione "dialoga" con la propria madre solo che non lo fa con l'ausilio della parola, ma grazie alla produzione degli ormoni che, direttamente o tramite meccanismi a cascata, permettono l'istaurarsi di un vero e proprio equilibrio fra le due parti anzi, come vedremo in seguito, potremmo parlare quasi di uno stato di "pace interna".

L'embrione fa di tutto per dialogare con la madre al fine di comunicarle la sua presenza nell'utero in modo da interrompere l'attività ciclica dell'ovaio. Questa comunicazione si esprime attraverso l'emissione di due segnali, detti per l'appunto "*segnali di gravidanza*". Il primo avviene attorno al 12° giorno dal concepimento, è mediato dagli estrogeni e coincide con il momento in cui l'embrione (blastocisti) fluttuante all'interno del corno uterino, comincia ad allungarsi formando dei caratteristici filamenti, di circa un metro di lunghezza (Levis D.G. 2001). Di lì a poco, vale la pena ricordarlo, attorno al 13° giorno incomincia l'annidamento nell'utero che si completerà a cavallo del 28° giorno. Fra il 17° ed il 25° giorno di gestazione, in concomitanza con lo sviluppo della placenta fetale, sopraggiunge il secondo segnale di gravidanza, anch'esso a base di estrogeni. Per entrambi i segnali di gravidanza vale la regola della dose dipendenza, cioè sono necessari almeno 5 embrioni per generare un flusso di estrogeni tale da confermare la gravidanza (Martineau G.P. 2003). Quindi approssimativamente attorno al mese di gestazione, incomincia il processo di ossificazione, ed è a questo punto che viene fissato il passaggio dalla vita embrionale a quella fetale (Martinat-Botté et al. 1998).

La presenza o la mancata emissione di questi segnali, sono alla base del proseguimento della gestazione o del ritorno in estro della scrofa. In particolare la mancata emissione di entrambi i segnali, conseguenza del mancato concepimento, o della morte embrionale precoce prima dell'annidamento (Maes D., 2009), determinerà un ritorno fra i 18 ed i 23 giorni dall'inseminazione che comunemente viene indicato come ritorno regolare (o ciclico). Qualora fosse presente il primo segnale di gravidanza, ma non il secondo, ecco che il ritorno si potrà presentare fra i 24 ed i 38 giorni. In tale condizione il ritorno in estro viene definito irregolare (o aciclico), dato che si colloca in uno spazio temporale fra il primo ed il secondo ritorno regolare consecutivo a 39 e 44 giorni (18-23 giorni + 21 giorni rispettivamente). Il caso del ritorno in estro aciclico corrisponde ad un effettivo concepimento, a cui però fa seguito la perdita della gravidanza poco dopo l'inizio della fase dell'annidamento, ma prima dell'ossificazione. Ciò che accade è che le vestigia degli embrioni rimasti, ritardano la lisi del Corpo Luteo rallentando così i tempi di ripresa dell'attività ovarica (Dial et al., 1992).

Viene da sé che solo se i due segnali sono positivi ci può essere la prosecuzione della gravidanza anche se dobbiamo fare delle precisazioni. In effetti dal 25° giorno di gestazione fino al periodo dell'ossificazione (convenzionalmente il 35° giorno) abbiamo

una finestra utile per poter spiegare fenomeni come l'ipoprolificità (la nascita di pochi suinetti fino anche ad uno solo) o addirittura la pseudogravidanza (molto rara per la verità), quindi una scrofa che "è convinta di essere gravida", manifestandone tutti i sintomi premonitori, che una volta messa in sala parto si rivela non gravida.

Tutto questo viene giustificato solo se nella finestra temporale sopra menzionata (più per esteso fra il 14° ed il 35° giorno di gestazione -Muirhead M. et al. 1997-) sopraggiungono problematiche in grado di interferire con la gestazione. Inoltre non essendo più richiesti un numero minimo di embrioni per confermare la prosecuzione della gravidanza (Martineau G.P. 2003), e qualora quelli presenti venissero in parte riassorbiti, si potrebbe spiegare il motivo per il quale al parto seguente nascano covate con un solo suinetto.

Lo scopo di questo lavoro è quello di analizzare la distribuzione dei ritorno in estro di scrofe e scrofette, per classi che saranno così ripartite: Ritorni Ciclici di primo tipo 18-23 (RC1); Ritorni Aciclici totali 24-38 (RA totali); Ritorni Ciclici di secondo tipo 39-44 (RC2). Verrà posta particolare attenzione ai Ritorni Aciclici totali. Per questi ultimi infatti saranno distinte la fase embrionale Ritorni Aciclici di primo tipo (da 24 a 30 giorni dall'inseminazione-RA1-) da quella fetale Ritorni Aciclici di secondo tipo (da 31 a 38 giorni dall'inseminazione-RA2-). I Ritorni in estro oltre il 44° giorno non sono stati analizzati.

La scelta di posizionare gli RC1 fra i 18 ed i 23 giorni (Buxadè C.C. et al., 2007), risulta più severa rispetto ad una parte della bibliografia internazionale che valuta tale classe sino al 24° giorno (Maes D., 2009; Martinat-Botté et al., 1998), ma più generosa di un'altra che posiziona i RC1 fra i 18 ed 22 giorni dall'inseminazione (Muirhead et al., 1997). Tuttavia è più in linea con l'esperienza di campo che individua nei 23 giorni un giusto compromesso fra Ritorni Ciclici di primo tipo ed i Ritorni Aciclici di primo tipo.

MATERIALI & METODI:

Nel presente lavoro sono stati analizzati i dati riproduttivi dell'anno 2008 e 2009 di due aziende suinicole (Azienda A ed Azienda B) collocate nella pianura Padana e distribuite fra le province di Piacenza e Reggio Emilia.

Le aziende presentano una consistenza numerica complessiva di circa 1300 scrofe, a ciclo aperto, con svezzamento bisettimanale (benda bisettimanale con svezzamento a 21 giorni per 10 bande) e uguale patrimonio genetico sia per le scrofe (ibrido inglese) che per i verri (Large White). La rimonta è per entrambe interna con l'introduzione, una volta all'anno, di scrofette Gran Parentali provenienti da nuclei di moltiplicazione esterni. Il seme è prelevato e confezionato in azienda ed il protocollo di ricerca degli estri e successiva inseminazione segue le stesse modalità. Nelle due annate valutate il personale preposto al management della gestazione è rimasto invariato. Il quadro sanitario evidenzia una negatività alla Malattia di Aujeszky, dichiarata da anni, ed una positività aziendale propria al ceppo Europeo del virus della PRRS.

A ciascun responsabile tecnico dalla gestazione delle due aziende, è stata consegnata una scheda (figura 1), denominata diagnostico dei ritorni, da compilare mensilmente. Infine abbiamo valutato la fertilità annuale e la distribuzione dei ritorni in estro suddivisa in base alle tre classi sotto elencate:

- RC1: fra i 18-23 giorni dall'inseminazione (corrispondenti a ritorni in estro regolari o in ciclo di primo tipo)
- RA totali: fra i 24 ed i 38 giorni dall'inseminazione (corrispondenti ai ritorni in estro irregolari o aciclici) a loro volta suddivisi in:

-RA1: dai 24 ai 30 giorni dall'inseminazione (di primo tipo o riassorbimenti

embrionali)

-RA2: dai 31 ai 38 giorni dall'inseminazione (di secondo tipo o perdite di gravidanza per aborti precoci)

- RC2: dai 39 ai 44 giorni dall'inseminazione (corrispondenti a ritorni in estro regolari o in ciclo di secondo tipo, quindi secondi ritorni in ciclo non visti negli RC1 e come tali decisamente imputabili ad errori manageriali, anche aborti).

Figura 1: Diagnostico dei ritorni: scheda compilata mensilmente.
Figure 1: Diagnostic returns sheet, compiled on monthly bases.

Diagnostico dei ritorni mese:.....

Fecondazioni	Gravide	Vuote	%fertilità

R<18	RC1 (18-23)	RA1 (24-30)	RA2 (31-38)	RC2 (39-44)	Metr	Zop	C.ov	Cist	Ripr	Tot	Morte	MiP

L'accertamento di gravidanza è stato effettuato fra i 21 ed i 35 giorni di gestazione da tecnici veterinari mediante l'impiego di apparecchiatura ecografia appropriata (ecoscan T-100 e sonda settoriale da 5 MHz)

Analisi statistica

Le percentuali di fertilità media annuale a 44 giorni, nelle due aziende e tra i due differenti allevamenti, le frequenze delle differenti classi di ritorno in estro rispetto ai Ritorni accertati e le differenti frequenze osservate nei RA1 (24-30 giorni dall'inseminazione) ed RA2 (fra i 31 ed i 38 giorni dall'inseminazione) rispetto ai RA totali 24-38gg totali, sono state confrontate tramite test χ^2 con livello di significatività $p<0.01$.

RISULTATI:

In tabella 1 vengono riproposte le fertilità medie, a 44 giorni di gestazione, dell'azienda A e B nel corso degli anni 2008 e 2009. Nessuna differenza statistica è stata osservata nelle percentuali di fertilità media a 44 giorni di gestazione, tra le due aziende e nei due anni a confronto ($p>0.01$). In questo contesto le scrofe non gravide comprendono, oltre ai ritorni in estro, anche quelle che dopo la fecondazione non hanno portato avanti la gravidanza per cause diverse: metriti, zoppie, cisti ovariche, scrofe e scrofette vuote alla diagnosi ecografica e poi riformate, oltre a quelle che non hanno risposto ai successivi trattamento ormonali.

Tabella 1: riepilogo totale della fertilità entro i 44 giorni di gestazione. Lettere differenti all'esponente indicano differenze statisticamente significative nella percentuale di fertilità media annuale a 44 giorni di gestazione.
Table 1: Summary of total fertility within 44 days of gestation. Different superscript letters indicate that differences in average annual fertility rate at 44 days of gestation were statistically significant, test χ^2 p<0.01

Azienda	FA tot	Non gravide	Gravide a 44 giorni	% fertilità media annuale a 44 giorni di gestazione
A 2009	2384	351	2033	85.2[a]
B 2009	1582	181	1401	88.5[a]
A 2008	2748	534	2214	80.5[a]
B 2008	1543	189	1354	87.7[a]

Nella tabella 2 viene riportata la distribuzione delle classi di ritorno in estro, all'interno delle scrofe non gravide delle due aziende per le due annate considerate. I Ritorni in estro ciclico di primo tipo (RC1) sono fra i 18 ed i 23 giorni dall'inseminazione, i Ritorni Aciclici totali (RA totali) sono fra i 24 ed i 38 giorni mentre quelli Ciclici di secondo tipo (RC2) sono fra i 39 ed i 44 giorni dall'inseminazione. Le frequenze delle differenti tipologie di ritorno in estro nelle due aziende e nelle due annate considerate globalmente, risultano statisticamente differenti tra loro, rispetto al totale dei ritorni accertati. In particolare RC1 18-23gg > RA totali 24-38gg > RC2 39-44gg in modo statisticamente significativo (p<0.01).

Tabella 2: Distribuzione delle classi di ritorno in estro: RC1 (ritorni ciclici fra i 18 ed i 23 giorni dall'inseminazione), RA totali (ritorni aciclici totali, fra i 24 ed i 38 giorni post inseminazione) e RC2 (ritorni ciclici fra i 39 ed i 44 giorni dall'inseminazione). Le percentuali di ciascuna classe sono calcolate sul totale dei ritorni accertati. Lettere differenti all'esponente indicano differenze statisticamente significative nelle frequenze delle differenti tipologie di classi di ritorno in estro rispetto ai ritorni accertati totali.
Table 2: Distribution of classes of sow return in estrus: RC1 (regular return between 18 and 23 days post insemination), total RA (total irregular return, between 24 and 38 days post insemination) and RC2 (regular return between the 39 and 44 days post insemination). The percentages of each class are calculated on total returns detected. Different superscript letters indicate that differences in the frequencies of different types of classes back in estrus compared to total return detected, were statistically significant. test χ^2 p<0.01

Azienda	Non gravide	Ritorni accertati	RC1 18-23gg		RA totali 24-38gg		RC2 39-44gg		Totale (ritorni accertati)
A 2009	351	158	79	50%	75	47.5%	4	2.5%	100%
B 2009	181	92	40	43.5%	46	50%	6	6.5%	100%
A 2008	534	272	160	59%	91	33.5%	21	7.5%	100%
B 2008	189	84	41	49%	36	43%	7	8%	100%
Totale	1255	606	320	53%[a]	248	41%[b]	38	6%[c]	100%

In tabella 3 i Ritorni Aciclici totali vengono suddivisi in Ritorni Aciclici di primo tipo (RA1), con estro individuato fra i 24 ed i 30 giorni post inseminazione e Ritorni Aciclici di secondo tipo (RA2), con estro individuato fra i 31 ed i 38 giorni dall'inseminazione. Rispetto agli RA totali, gli RA1 24-30gg risultano maggiormente frequenti in modo statisticamente significativo ($p<0.01$)

Tabella 3: I Ritorni Aciclici totali sono suddivisi in: RA1 (24-30 giorni dall'inseminazione) ed RA2 (fra i 31 ed i 38 giorni dall'inseminazione). Le percentuali di ciascuna classe sono calcolate sul totale dei ritorni accertati. Lettere differenti all'esponente indicano differenze statisticamente significative nelle frequenze dei RA1 24-30gg e dei RA2 31-38gg rispetto ai RA totali.

Table 3: Total Irregular Returns are divided into: RA1 (24-30 days post insemination) and RA2 (from 31 to 38 days post insemination). The percentages of each class are calculated on total returns detected. Different superscript letters indicate that differences in the frequencies of 24-30 days of RA1 and RA2 31-38gg compared to total RA, were statistically significant, test χ^2 $p<0.01$

Azienda	Non gravide	Ritorni accertati	RC1 18-23gg		RA totali				RC2 39-44gg	
					RA1 24-30gg		RA2 31-38gg			
A 2009	351	158	79	50%	51	32.5%	24	15%	4	2.5%
B 2009	181	92	40	43.5%	36	39%	10	11%	6	6.5%
A 2008	534	272	160	59%	52	19%	39	14.5%	21	7.5%
B 2008	189	84	41	49%	26	31%	10	12%	7	8%
Totale	1255	606	320	53%	165	27% [a]	83	14% [b]	38	6%

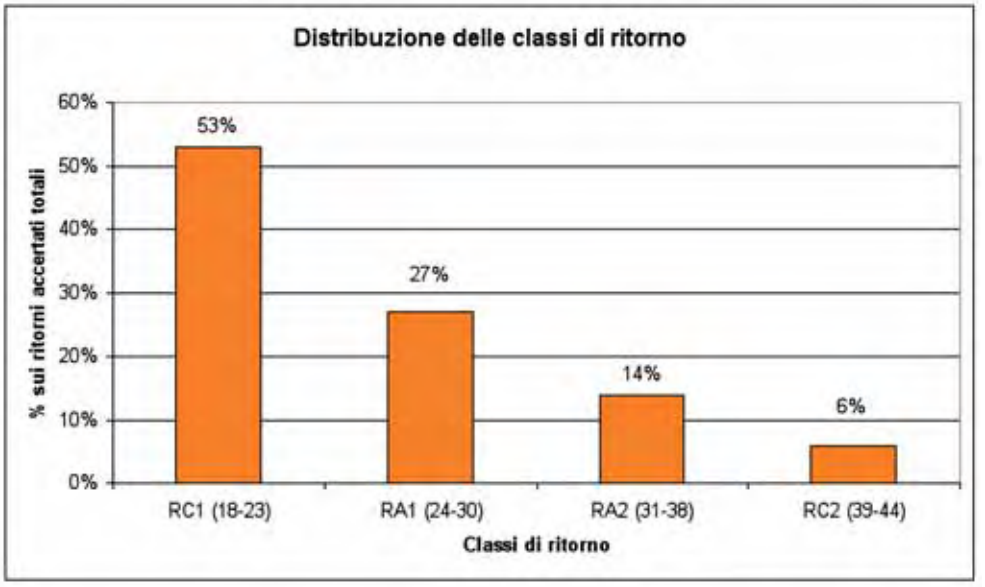
DISCUSSIONE:

Oltre ad avere un analogo inquadramento zootecnico sanitario, anche la percentuali di fertilità media a 44 giorni di gestazione, tra le due aziende e nei due anni, è risultata confrontabile (tabella 1).

La statistica legata alla tabella 2, conferma quella che è la sensazione di campo, cioè che i Ritorni Ciclici di primo tipo siano maggiori dei ritorni Aciclici totali che a loro volta superano i ritorni Ciclici di secondo tipo. Questo dato evidenzia certamente una minore stabilità generale della prima parte della gestazione rispetto alle fasi successive, a dimostrazione che la vita fetale presenta caratteristiche di equilibrio maggiori.

Osservando la tabella 3, è impossibile non rilevare un andamento progressivamente decrescente dei dati legati ai ritorni in estro delle due aziende nelle due annate considerate. Anzi volendone esprime graficamente le distribuzioni (Figura 2), risulta singolare che fra una classe e l'altra vi sia all'incirca una differenza del 50%. Inoltre vale la pena sottolineare che in valore assoluto circa l'80% dei ritorni in estro è collocato nelle prime due classi (quindi entro i 30 giorni di gestazione), conferendo a questa prima fase della gestazione un ruolo certamente chiave per il raggiungimento di risultati zootecnici importanti.

Figura 2: Distribuzione dei ritorni in estro sui ritorni in estro totali accertati nelle aziende A e B
Figure 2: Distribution of in estrus returns compared with total in estrus returns established in farm A and B



Troviamo interessante osservare che qualora dividessimo i Ritorni Aciclici totali (RA totali) nelle due classi RA1 ed RA2, la loro distribuzione risulta significativamente maggiore nella prima rispetto alla seconda, inoltre, come valore assoluto, gli RA1 da soli rappresentano circa ¼ dei ritorni in estro totali accertati.

La spiegazione di questo fatto potrebbe essere legata alla precarietà della fase di gestazione in cui si trova la scrofa. Siamo infatti verso la fine del secondo segnale di gravidanza e nel bel mezzo dell'annidamento eventi che, come sappiamo, possono ricevere l'interferenza negativa da parte di diversi agenti, zootecnici, sanitari, ma soprattutto ambientali. Questo è ancora più vero, soprattutto per quella minima parte di scrofe, definite *sottopopolazioni*, molto più sensibili alle avverse condizioni ambientali, più di quanto non accada nelle altre scrofe, anche se il motivo di questa maggiore sensibilità resta ancora sconosciuto (Kirkwood R. 2002, 2003).

Per il mantenimento della gravidanza ricopre un ruolo decisivo anche il corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (*"teoria dell'LH"*) della scrofa, in effetti ne viene documentata una notevole sensibilità durante tutta la gestazione, ma particolarmente nella prima fase, peraltro agli stessi fattori in grado di interferire negativamente sugli embrioni (Martineau G.P. 2003).

La comprensione di questi meccanismi riveste un'importanza tutt'altro che secondaria dato che rappresentano la base per spiegare le cause non infettive di infertilità nella scrofa che, e vale sempre la pena ricordarlo, sono da sole circa il 70% del totale degli aborti (Muirhead M. et al. 1997, Martineau G.P. 2003) rilevati in allevamento, nel corso dell'intero anno.

Per i Ritorni aciclici di primo tipo sarebbe meglio parlare di mortalità embrionale (*riassorbimenti embrionali*) che possono evidenziarsi clinicamente con le caratteristiche placentine rossastre le quali, filando dalla vulva verso il pavimento, celano al loro interno l'embrione. Nella maggioranza dei casi la scrofa è asintomatica (Levis D.G. 2001, Martineau G.P. 2003), ma la fuoriuscita degli embrioni viene accolta dell'allevatore con una certa inquietudine e spesso

l'evento viene interpretato come un forte campanello d'allarme per la sanità dell'azienda. Tuttavia i riassorbimenti non sempre sono visibili sia per un'azione diretta dell'utero della scrofa, in grado per l'appunto di riassorbire gli embrioni, e sia per la presenza dei pavimenti in grigliato, legati alla stabulazione delle scrofe stesse che, inevitabilmente, possono impedirne la permanenza sotto il posteriore dell'animale.

Lo strumento migliore per confermare una diagnosi di riassorbimento embrionale rimane certamente l'ecografo, che fra i 21 ed i 30 giorni dalla fecondazione permette di individuare quadri davvero inconfondibili (Gherpelli M., 1999). Certamente non è in grado di differenziarne l'eziologia, ormonale od infettiva, ma se maneggiato con perizia rimane, allo stato dell'arte, lo strumento più rapido ed efficace per preparare l'allevatore all'imminente ritorno aciclico della scrofa che, e l'esperienza lo conferma, presenta elevate percentuali di fertilità.

CONCLUSIONI:

I dati emersi dal presente lavoro mettono in evidenza che, così come era lecito attendersi, la classe con il maggior numero di ritorni in estro è rappresentata da quella dei ritorni ciclici di primo tipo (RC1). Quello che però si vuole evidenziare è il particolare comportamento dei Ritorni Aciclici totali (RA totali). Effettivamente la loro suddivisione nei due tipi 1 e 2, in grado di rappresentare meglio lo sviluppo della gravidanza con il passaggio dalla vita embrionale (Ritorni Aciclici di primo tipo fra i 24 ed i 30 giorni) a quella fetale (Ritorni Aciclici di secondo tipo fra i 31 ed i 38 giorni), ha permesso di evidenziare un maggiore numero di Ritorni Aciclici collocati nel primo tipo. Questo dato è a dimostrazione che la mortalità embrionale tardiva, ha un ruolo predominante rispetto alla mortalità fetale precoce all'interno dei Ritorni Aciclici totali. Crediamo che il dato possa meritare una qualche attenzione per poter meglio valutare le possibilità di un qualche intervento, soprattutto oggigiorno dove, a seguito dell'applicazione della norma per la protezione dei suini, c'è la necessità di imbrancare tanto le scrofe, quanto le scrofette, proprio alla quarta settimana di gestazione.

Una fase successiva a questo lavoro, sarà quella di estendere la raccolta dati ad un maggior numero di aziende, mantenendo la suddivisione delle classi proposte, per confrontarne l'andamento. Disponendo di un maggior numero di dati, potrebbe essere possibile inoltre verificare l'influenza che altri fattori quali stagionalità e malattie, possono avere sulle varie classi di ritorno.

RINGRAZIAMENTI

Sentiamo l'obbligo di ringraziare la "Sus Scrofa" escuela porcina, ed in particolare la collega Telma Tucci ed il collega Enric Marco Granell, che con i loro seminari di formazione, hanno suscitato in noi l'interesse per questo argomento.

Bibliografia:

Buxadè C.C.., Granell E.M., Montes D.L. (2007). La compleja fase de la gestaciòn. In "La cerda reproductora: claves de su optimizaciòn productive". Cap VIII, Editorial Euroganaderìa, 313-361

Dial G., Marsh W., Polson D., Vaillancourt J. (1992) "Reproductive failure: Differential Diagnosis" In: Leman A.L., Straw B.E., Mengeling W.L., d'Allaire S., Tajlor D.J. (1992). Diseases of swine, 7th ed., Iowa State University Press, Ames, 88-137

Gherpelli M (1999) "Quadro ecografico della mortalità embrionale nella scrofa", XXV Meeting annuale SIPAS, Brescia 26-27 Marzo, 147-155

Kirkwood R. (2002) "Seasonal infertility-current understandings", Swine Disease Conference for Swine Practitioners 2002, Iowa State University, 118-121

Kirkwood R. (2003) "Understanding and managing seasonal infertility", Allen D. Leman Swine Conference 2003, University of Minnesota, 164-168

Levis D.G. (2001) "What's New with Seasonal Infertility?", George A. Young Swine Conference 2001, University of Nebraska, 28-64

Maes, D. (2009). "Non-infectious reproductive problems in the sow: an overview", Proceedings 1st ESPHM, Copenhagen DK, 27-28 Agosto, 14-21.

Martinat-Botté F., Renaud G., Madec F., Costiou P., Terqui M. (1998) "Echographie & reproduction chez la truie", Paris, INRA ed.

Martineau GP (2003) "Non infectious abortions in saws", 10th International Symposium on Pig Reproduction and Artificial Insemination, Rome 5-7 May.

Muirhead M.R., Alexander T.J.L. (1997) "Managing Pig Health and the Treatment of Disease", 1ª ed., 5 M Enterprises Ltd, UK.

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

LESIONI PODALI E BENESSERE ANIMALE – INDAGINI PRELIMINARI IN SUINI REGOLARMENTE MACELLATI

DISEASES OF FEET IN REGULARLY SLAUGHTERED PIGS AND ANIMAL WELFARE – PRELIMINARY INVESTIGATIONS

PERRONE V.[1], MARRUCHELLA G.[2], CITO G.[1]

[1]Azienda U.S.L. Roma B, Servizio Veterinario, Dipartimento di Prevenzione, Viale P. Togliatti, 1280 – 00155 Roma; [2] Università degli Studi di Teramo, Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro, 45 – 64100 Teramo.

Parole chiave: suino, lesioni podali, mattatoio, benessere animale.

Key words: swine, foot lesions, slaughterhouse, animal welfare.

RIASSUNTO

Il benessere animale è attualmente oggetto di grande attenzione da parte del consumatore, degli operatori impegnati nelle diverse filiere produttive e del legislatore. Nella suinicoltura moderna, la pavimentazione costituisce un punto critico rilevante per il controllo del benessere animale, tanto da essere esplicitamente presa in considerazione dalla normativa vigente. La presente comunicazione si pone l'obiettivo di valutare la possibilità di mettere in relazione la prevalenza/gravità delle lesioni podali osservate al momento della macellazione con le condizioni di allevamento, e più in particolare con la tipologia e/o stato di manutenzione della pavimentazione. Nonostante il carattere del tutto preliminare, la nostra indagine conferma che le patologie podali sono di frequente riscontro nei suini allevati intensivamente. Tale osservazione ha ricadute importanti sulla redditività delle produzioni animali e sul benessere del suino nei moderni sistemi di allevamento, due problematiche strettamente interconnesse fra di loro.

ABSTRACT

End consumers, professionals employed in animal productions, and legislators now focus their attention on animal welfare. In modern pig herds, the floor represents a key critical point for animal welfare, thus being specifically ruled. Authors aim at evaluating the relationships between foot lesions observed at slaughterhouse and the floor type/condition. Preliminary data confirm that foot lesions are commonly detected in pigs. Such findings likely impact on swine herd profit and welfare, which are tightly related.

INTRODUZIONE

Il benessere animale è oggetto di una crescente attenzione, non soltanto da parte del mondo scientifico ma anche dell'opinione pubblica. Il benessere animale è così diventato argomento di grande attualità, oggetto di discussioni e dibattiti tra allevatori, consumatori e tutti coloro che operano nel settore delle produzioni animali. Le scelte dei consumatori condizionano le modalità di produzione degli alimenti di origine animale; inoltre, alla tutela del benessere animale viene riconosciuta, anche a livello normativo, notevole importanza per quel che concerne la sicurezza alimentare. A questo assunto non sfugge il moderno allevamento del suino che nell'incremento

del livello di benessere, oltre ad ottemperare ad un obbligo di legge, deve vedere la possibilità di portare valore aggiunto alle produzioni suinicole (Tosi *et al*., 2003; D.L.vo n. 146/2001; Dir. n. 2008/120/CE).
Il tipo di pavimentazione utilizzato negli allevamenti intensivi costituisce uno dei maggiori punti critici per il controllo del benessere animale in suinicoltura, tanto da essere specificamente preso in considerazione dalla normativa vigente (D.L.vo n. 534/1992; D.L.vo n. 53/2004). Pavimentazioni inappropriate sono la causa più comune di lesioni agli arti. Le zoppie nei suini rappresentano un costo elevato per l'industria; basti pensare che nel Regno unito tale danno è stimato in circa 4.5 miliardi/anno di sterline. La presenza di zoppie costituisce una sofferenza per l'animale: ciò porta ad una ridotta capacità di movimento, compromettendo la competizione per l'alimento e l'acqua (Tosi *et al*., 2003).
Una registrazione sistematica delle lesioni riscontrate sugli animali può fornire importanti informazioni, utili non solo alla valutazione del livello di benessere ma anche all'individuazione dei punti critici cui apportare miglioramenti (Lazzarini *et al*., 2002; Tosi *et al*., 2003). In tal senso, il mattatoio si propone quale utile punto di osservazione privilegiato, potenzialmente in grado di offrire informazioni preziose agli allevamenti di provenienza (Reg. CE n. 854/2004).
La presente comunicazione si pone l'obiettivo di valutare, in via del tutto preliminare, l'impatto delle lesioni podali nei suini regolarmente macellati e la possibilità, in un prossimo futuro, di mettere in relazione la prevalenza/gravità di tali lesioni con le condizioni di allevamento, e più in particolare con la tipologia e/o stato di manutenzione della pavimentazione.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta durante il terzo trimestre del 2009 su circa 10.000 suini pesanti, provenienti da allevamenti intensivi nazionali in grossa prevalenza del centro-nord Italia e regolarmente macellati presso un mattatoio industriale di Roma. Per questioni pratiche, l'attenzione per il momento è stata rivolta nei confronti degli arti anteriori osservando gli unghioni la cui rimozione necessitava dell'intervento diretto del personale addetto alla catena di macellazione (di norma il passaggio nella vasca di scottatura alla temperatura d'uso è sufficiente a favorirne la successiva asportazione meccanica). I singoli unghioni sono stati quindi ispezionati e si è proceduto a riportare le lesioni osservate.

RISULTATI

La rimozione manuale degli unghioni si è resa necessaria nel 15% dei suini oggetto di indagine, mentre la prevalenza totale delle lesioni podali è stata pari al 5%. Nella grande maggioranza dei casi, le lesioni osservate erano riferibili a quadri più o meno gravi di pododermatite cronica (Fig. 1). Tali lesioni si associavano talvolta a perdita di sostanza ed alla presenza di tragitti fistolosi, chiaro indice di insorgenza di complicanze settiche. Meno frequente il riscontro di lesioni del corno da ipoconsumo e le fratture longitudinali della parete della scatola cornea.

Fig. 1 – Grave forma di pododermatite cronica caratterizzata dalla abnorme proliferazione di tessuto epiteliale sui talloni. Il tessuto epiteliale esuberante assume aspetto villoso od a cavolfiore e non raggiunge la normale cheratinizzazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante il suo carattere del tutto preliminare, la nostra indagine conferma che le patologie podali sono di frequente riscontro nei suini allevati intensivamente. Tale osservazione ha ricadute importanti sulla redditività delle produzioni animali e sul benessere del suino nei moderni sistemi di allevamento, due problematiche strettamente interconnesse fra di loro. Alle perdite economiche causate dalle lesioni podali – in termini di mortalità, ridotto accrescimento, incremento delle spese medico-veterinarie, deprezzamento di alcune parti della carcassa – si aggiungano quelle conseguenti ai maggiori costi di macellazione, aspetto particolarmente sentito negli stabilimenti industriali ad elevata capacità.

Resta, invece, da valutare fino a che punto l'osservazione al mattatoio delle lesioni podali possa costituire un valido ausilio in grado di fornire utili informazioni "di ritorno" all'allevatore, tali da indurre a modificare e migliorare le caratteristiche della pavimentazione, e più in generale dei materiali di costruzione. A tal proposito, vale la pena ricordare che lo stato della pavimentazione è uno dei requisiti la cui valutazione di conformità è prevista dalla Decisione n. 778/06 per il benessere animale (Gaidella e Cantoni, 2009). In virtù di quanto sopra, è intenzione degli Autori procedere ad una più attenta, sistematica ed estesa valutazione delle lesioni podali, da mettere in relazione con le caratteristiche strutturali degli allevamenti di provenienza delle singole partite di animali.

BIBLIOGRAFIA

Gaidella L., Cantoni C., (2009) "Il Piano Nazionale per il Benessere Animale in allevamento". XXXV Meeting Annuale SIPAS, Modena, 12-13 marzo 2009, pagg. 417-421.

Lazzarini C., Rota Nodari S., Pezzetti R., Candotti P. (2002) "Il benessere animale nella specie suina". Praxis Veterinaria 23, 15-20.

Tosi M.V., Canali E., Mattiello S., Ferrante V., Carenzi C., Verga M. (2003) Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento. Ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, pagg. 13-43.

VALUTAZIONI PRELIMINARI DEGLI EFFETTI DEL LUNGO TRASPORTO SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA DEL SUINETTO

IMPACT OF A LONG-DISTANCE JOURNEY ON INNATE IMMUNITY OF PIGLETS: A PRELIMINARY REPORT

RAZZUOLI E[1]., CAFAZZO S[2]., MAGNANI D[2]., CALA' P[2]., DOTTI S[1]., ARCHETTI IL[1]., NANNI COSTA L[2]., AMADORI M[1].

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" Sede di Brescia, [2]Facoltà di Agraria, Università di Bologna;
Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-alimentare

Parole Chiave: suinetto, stress, trasporto, parametri immunologici
Keywords: piglet, stress, transport, immunological parameters

RIASSUNTO

Nell'ambito di un'ampia sperimentazione finalizzata a valutare la risposta del suinetto a trasporti di lunga durata (>8 ore), si riportano i risultati di una prova preliminare su 48 suinetti svezzati; di questi 36 sono stati sottoposti ad un viaggio di quindici ore e 12 hanno invece costituito il gruppo di controllo. I soggetti, mantenuti in uno stabulario sperimentale prima e dopo il trasporto, sono stati sottoposti a valutazioni periodiche dello stato clinico e ad una serie di prelievi di sangue a -2, 0, +5 e +15 giorni dal trasporto, al fine di valutare alcuni parametri immunologici (Lisozima, Aptoglobina, Complemento, Battericidia Sierica, Interleuchina-6, *Tumor Necrosis Factor*-α e Interferone-α). Durante la permanenza dei suinetti nello ~~in~~ stabulario si è provveduto alla registrazione della temperatura e dell'umidità al fine di valutare il microclima ambientale; è stata inoltre effettuata la registrazione degli stessi parametri sull'automezzo durante il trasporto. Nelle condizioni di viaggio esaminate i suinetti non hanno mostrato alcuna alterazione dei parametri clinici ed immunologici riferibile al trasporto. Le variazioni osservate tra i diversi prelievi hanno invece evidenziato una reazione di adattamento alle nuove condizioni di allevamento nello stabulario sperimentale, influenzata, a sua volta, dagli esiti di una forma diarroica manifestatasi nella fase antecedente al trasporto.

ABSTRACT

As part of a large-scale study designed to evaluate the response of piglets to long-distance transport, results of a preliminary test on 48 subjects, 36 transported for 15 hours and 12 rested as control, are reported. Piglets were reared for 28 days in an experimental piggery. They were subject to regular assessments of clinical status and to blood samplings at days -2, 0, +5 and +15 with respect to transport date. Serum samples were used to assess some immunological parameters (Lysozyme, Haptoglobin, Complement, Serum Bactericidal Activity, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-α). Temperature and relative humidity in the facility and in the vehicle during the journey were also recorded. Under

the travel conditions under study, the piglets did not show any clinical and immunological response to the transport treatment. The time-course of immunological parameters showed instead a link with the animals' adaptation to the new housing conditions in the experimental piggery and a diarrhoic syndrome occurred before transportation.

Introduzione

Il trasporto costituisce un fattore di stress ben noto per gli animali di interesse zootecnico. Esso si configura come un'operazione assai complessa, articolata in fasi distinte di carico, trasporto vero e proprio, scarico in azienda o nelle aree di sosta annesse agli impianti di macellazione. In tali fasi agiscono sugli animali fattori stressogeni di natura fisica e psico-neuro-immunologica che possono predisporre all'insorgenza di patologie diverse e variegate (Broom, 2005). E' evidente che l'influenza di questi fattori può essere tanto più rischiosa per la salute degli animali quanto più sono in giovane età. I principali meccanismi fisio-patologici e comportamentali di risposta allo stress da trasporto sono ormai ben noti. In questo ambito, la ricerca scientifica ha approfondito 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* ambientali, sia di origine infettiva che non infettiva (Amadori M., 2007). In tale contesto, lo scopo di questo lavoro preliminare è stato quello di valutare l'effetto del lungo trasporto, effettuato in condizioni microclimatiche controllate, sulla capacità di recupero omeostatico e sulla risposta immunitaria innata dei suinetti.

Materiali e Metodi

1.1 Animali
Il protocollo sperimentale è stato preventivamente approvato dal Comitato Etico dell'Università di Bologna nell'ambito di una sperimentazione più ampia sul trasporto dei suinetti di cui il presente lavoro costituisce la parte iniziale.
In un allevamento di suini a ciclo chiuso sono stati selezionati 48 soggetti [Duroc x (Landrance x Large White)] bilanciati per sesso e nati da parti contemporanei. A 10 giorni di vita tutti gli animali sono stati identificati tramite marca auricolare e sottoposti ad una valutazione clinica generale, al fine di escludere i soggetti con stati patologici, che potessero influenzare negativamente l'esito della sperimentazione.

1.2 Piano sperimentale
All'età di 35 giorni, nel mese di maggio del 2009, i suinetti sono stati trasferiti nello stabulario del Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare dell'Università di Bologna ove, dopo un periodo di adattamento (7 giorni), sono stati suddivisi in due gruppi: gruppo C (Controllo) formato da 12 soggetti e il gruppo T (Trasporto) formato da 36 soggetti. I suinetti del gruppo T sono stati sottoposti ad un viaggio della durata di 15 ore, durante il quale l'automezzo ha percorso un itinerario circolare, con partenza ed arrivo allo stabulario, transitando inizialmente in Pianura Padana, proseguendo con l'attraversamento dell'Appennino e l'arrivo sulla costa del Mar Tirreno per poi rientrare in Pianura Padana. Il trasporto è stato effettuato in conformità con le norme previste dal Reg. UE n. 1/2005. Nei quindici giorni successivi al trasporto è stato monitorato lo stato sanitario degli animali che, al termine di tale periodo, sono stati riconsegnati all'allevamento di provenienza. Durante l'esperimento si è provveduto a monitorare tramite sonde (HOBO Pro v2 Data Logger), la temperatura e umidità relativa sia sul camion che in allevamento.

1.3 Prelievi ed analisi di laboratorio

Ogni soggetto è stato sottoposto ad un prelievo di sangue, in provette prive di anticoagulante, a 2 giorni dal trasporto (T-2), dopo una settimana dall'ingresso in stabulario, subito dopo il trasporto (T0), a 5 giorni (T+5) e a 15 giorni (T+15) dal trasporto. Il campione di sangue è stato conservato a temperatura ambiente per 2 ore e successivamente centrifugato a 4°C per 15 minuti a 2000 rpm; in seguito è stato raccolto sterilmente il siero, conservato in aliquote a -80°C. Su tali campioni, sono state valutate le concentrazioni di Aptoglobina (Kit Phase Haptoglobin, Celbio, cod. TP 80), complemento emolitico (Seyfarth 1976), Lisozima (Osserman e Lawlor, 1966), battericidia sierica (Dorn et al., 1980) e di alcune importanti citochine: *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-α (Asai et al. (1993), Interleuchina-6 (IL-6) (Grenett et al. 1991), Interferone (IFN)-α (Meager, 1987).

1.4 Analisi statistica

Si è provveduto a valutare preliminarmente la normalità delle distribuzioni per i valori ottenuti per i parametri immunologici esaminati. I valori sono stati normalizzati con l'elevazione al quadrato per la Battericidia e con la trasformazione in logaritmo per Lisozima, Complemento ed Aptoglobina. I dati sono stati poi elaborati mediante la procedura Mixed del programma SAS (SAS, 1996) impiegando un modello per analisi ripetute che ha incluso come fattore random il soggetto e come fattori fissi il prelievo, il trasporto e la rispettiva interazione. Quest'ultima non è mai risultata statisticamente significativa (P>0.05) e pertanto è stata esclusa dal modello. I tre gradi di libertà del fattore "prelievo" sono stati ripartiti in altrettanti confronti ortogonali finalizzati alla valutazione delle differenze tra prelievi successivi (T-2 *vs* T0, T0 *vs* T+5, T+5 *vs* T+15). Per i dati relativi alle analisi delle citochine TNF-α e IL-6 sono stati calcolati i valori corrispondenti al 75mo percentile, mentre per l'IFN-α è stata registrata la sua presenza/assenza.

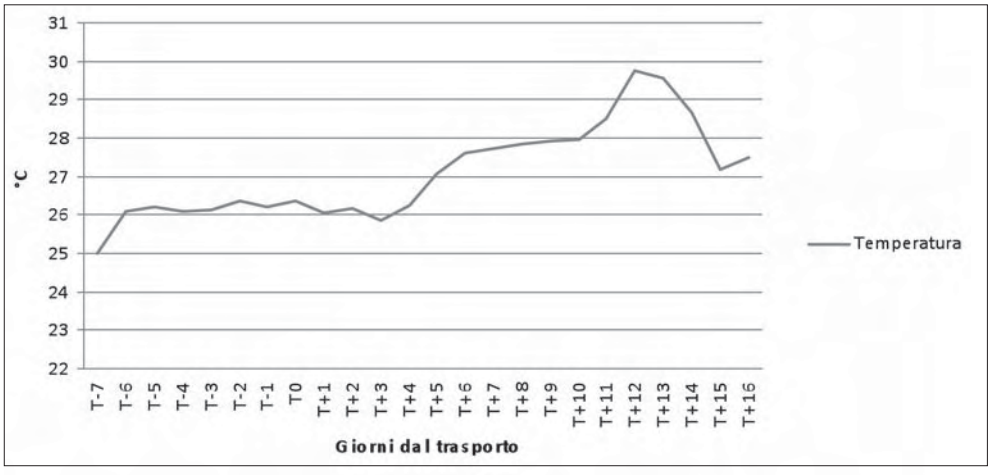
Risultati

Lo stato sanitario degli animali non è risultato ottimale successivamente all'entrata in stabulario. Infatti molti suinetti hanno presentato diarrea in assenza di rialzo febbrile nella prima settimana di permanenza nel nuovo ambiente (settimana di adattamento).

Le condizioni climatiche nelle quali è stata effettuata le prova sono descritte nelle Figure 1, 2, 3, e 4. I valori di temperatura registrati nello stabulario si sono collocati nei *range* di termoneutralità per i suinetti (Fig 1).

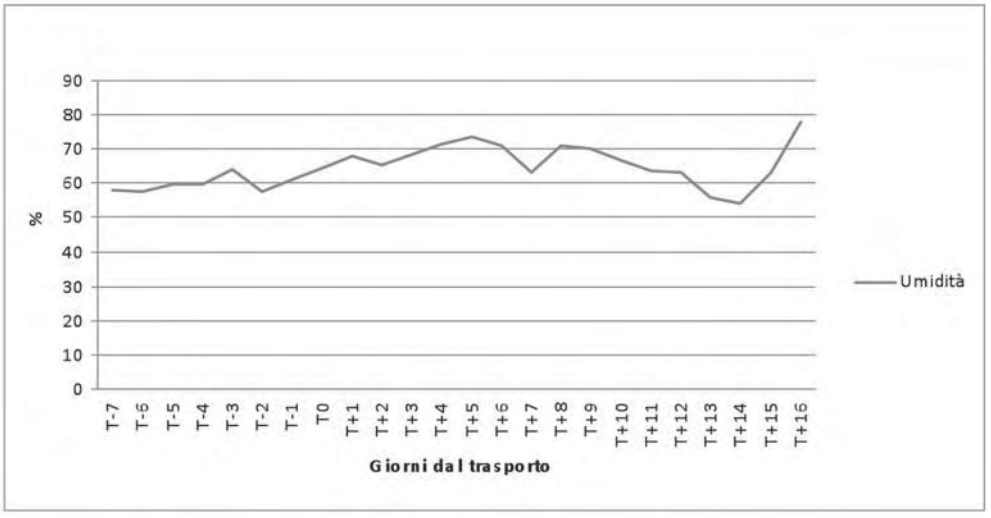
Fig 1: Andamento della temperatura (C°) media alle ore 12 nello stabulario.

Time-course of mean temperature (°C) at 12 o'clock in the piggery



Il rilievo dell'umidità relativa in stabulario (Fig 2) indica che i valori medi minimi (50,06±7,08) e massimi (68,35±10,35) si rilevano, rispettivamente, a 14 e 16 giorni dal trasporto

Fig 2: Andamento dell'umidità relativa (%) media alle ore 12 nello stabulario
Time-course of mean relative humidity (%)at 12 o'clock in the piggery



Anche l'andamento registrato durante il trasporto di queste due variabili non ha mostrato aspetti particolari (Fig 3 e 4).

Fig 3: Valori di temperatura (°C) rilevati durante il trasporto su camion ed in allevamento
Temperatures (°C) during truck transportation (camion) and in the piggery (sala)

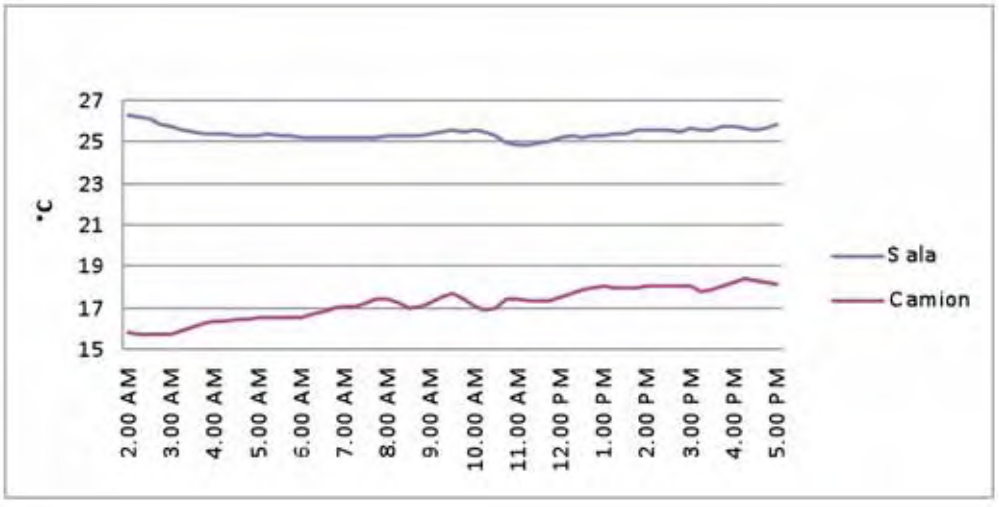
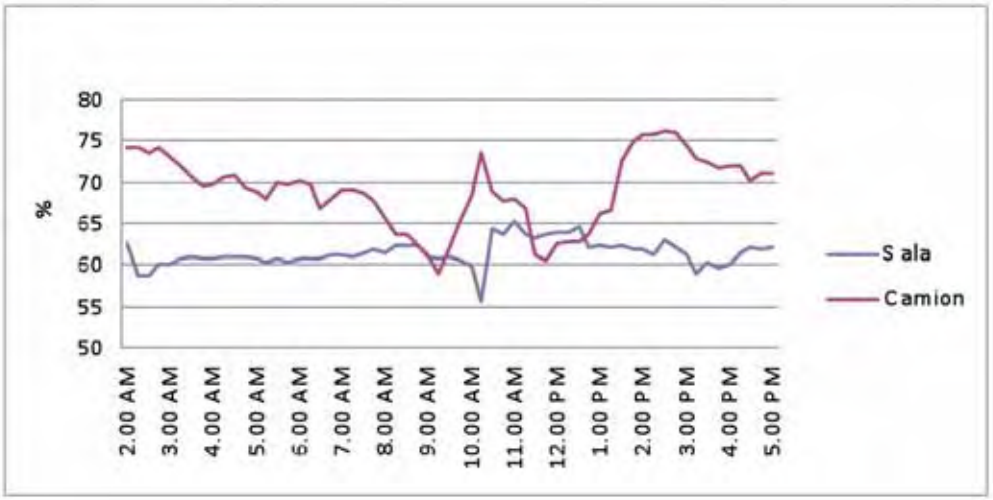


Fig 4: Valori di Umidità Relativa (%) rilevati durante il trasporto nel camion ed in allevamento.
Relative humidity (%) during truck transportation (camion) and in the piggery (sala



L'analisi statistica dei dati relativi ai parametri immunologici ha evidenziato che il fattore tempo ha esercitato un'influenza statisticamente significativa sui valori di Lisozima, Complemento, Aptoglobina e Battericidia, mentre non è emerso alcun effetto significativo attribuibile al fattore trasporto, sia considerato da solo che in relazione con il tempo di prelievo. La tabella 1 (Tab 1) riporta il valore medio e la deviazione standard per i diversi tempi di prelievo, senza considerare la suddivisione nei gruppi Trasporto e Controllo; la significatività dei confronti T-2 *vs* T0, T0 *vs* T+5, T+5 *vs* T+15 si riferisce ai valori trasformati.
Al fine di evidenziare l'assenza dell'effetto del trasporto sui parametri immunologici, nella tabella 2 (Tab 2) sono riportati i valori medi e la deviazione standard dei suddetti parametri nei soggetti trasportati e non trasportati ai diversi tempi di prelievo. Dal suo esame emerge, per tutti i parametri, la piena corrispondenza degli andamenti tra i due gruppi in ciascuno dei prelievi effettuati.

Tab 1. Valori medi (± deviazione standard) dei parametri immunologici ai diversi prelievi.
Mean values (± standard deviation) of immunological parameters at different sampling time

Parametri	**Unità di Misura**	**T-2**	**T0**	**T+5**	**T+15**
Lisozima	µg/ml	7,47 ± 2,41 **a**	5,52 ± 1,94 **b**	4,75 ± 0,98 **b**	6,82 ± 1,90 **a**
Aptoglobina	mg/ml	1,48 ± 0,77 **a**	1,03 ± 0,80 **b**	0,58 ± 0,65 **a**	1,08 ± 0,71 **b**
Complemento	$C'H_{50}$/100 µl	48,27 ± 27,82 **a**	83,53 ± 41,24 **b**	64,66 ±12,34**a**	78,85 ± 27,33 **b**
Battericidia	**%**	53,85 ± 7,09 **a**	61,54 ± 5,94 **b**	51,62 ± 5,44 **a**	50,17 ± 6,56 **a**

Lettere diverse indicano differenza statisticamente significative (P<0,05).
Different alphabet letters indicate significant differences (P< 0.05).

Tab 2: Valori medi (± deviazione standard) dei parametri immunologici ai diversi tempi di prelievo per i gruppi Controllo e Trasporto.
Mean values (± standard deviation) of immunological parameters at different sampling time for group C and T.

Parametri	Unità di Misura	T-2	T0	T+5	T+15
Lisozima (Controllo)	µg/ml	6,78 ± 2,26	5,40 ± 1,30	4,98 ± 0,96	7,22 ± 2,10
Lisozima (Trasporto)	µg/ml	7,71 ± 2,45	5,68 ± 2,09	4,67 ± 0,99	6,69 ± 1,84
Aptoglobina (Controllo)	mg/ml	1,47 ± 0,53	1,14 ± 0,89	0,36 ± 0,35	1,02 ± 0,75
Aptoglobina (Trasporto)	mg/ml	1,48 ± 0,84	1,00 ± 0,78	0,65 ± 0,71	1,09 ± 0,71
Complemento (Controllo)	$C'H_{50}$/100 µl	43,9 ± 27,41	88,60 ± 65,27	57,9 ± 8,85	83,1 ± 33,67
Complemento (Trasporto)	$C'H_{50}$/100 µl	52,1 ± 27,49	81,8 ± 30,5	66,9 ± 12,61	77,4 ± 25,27
Battericidia (Controllo)	%	53,83 ± 6,94	61,25 ± 7,25	52,83 ± 5,51	52,75 ± 4,45
Battericidia (Trasporto)	%	53,86 ± 7,25	61,64 ± 5,43	51,22 ± 5,43	49,31 ± 6,96

I livelli sierici medi di Lisozima si sono collocati al di sopra del limite di 5 µg/ml considerato il valore di riferimento per i soggetti della categoria zootecnica considerata (http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20Benessere%20animale/Attivita/Immunologia_clinica/Biochimica1.pdf). I valori di tale parametro hanno mostrato una significativa diminuzione dal primo al secondo prelievo, a cui è seguito un ulteriore decremento in corrispondenza del terzo ed un incremento significativo da quest'ultimo al quarto. Un analogo andamento è emerso anche per l'Aptoglobina i cui livelli medi sono risultati tutti compresi entro il nostro *range* di riferimento di 0,2 – 2 mg/ml. Le variazioni dei dati medi del Complemento tra i diversi prelievi sono risultate tutte statisticamente significative. I valori sono aumentati significativamente dal primo al secondo prelievo per poi successivamente ridursi ed infine ritornare a crescere in corrispondenza del quarto prelievo. Fatta eccezione per il primo prelievo i valori medi di tale parametro son rimasti al disopra del limite di riferimento pari a 50 $C'H_{50}$/100 µl (Moscati et al. 2003). La Battericidia ha mostrato valori medi tutti superiori al 40%, considerato il limite inferiore di riferimento presso il nostro laboratorio (http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20Benessere%20animale/Attivita/Immunologia_clinica/Biochimica1.pdf). L'andamento di questo parametro è risultato analogo a quello del complemento fino a 5 giorni dopo il trasporto; tra T+5 e T+15 non ha subito variazioni significative contrariamente a quanto osservato per il complemento.
Nella tabella 3 (Tab 3) sono riportati i valori di 75mo percentile delle Citochine TNF-α, IL-6 ed i casi di positività per IFN-α, suddivise per i gruppi Controllo e Trasporto.

Tab 3: Valori di sierici delle citochine saggiate; viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione
Concentrations of cytokines in pig sera. Results are expressed as 75th percentile values

Parametri	Unità di Misura	T-2	T0	T+5	T+15
IL-6 (Controllo)	pg/ml	1775,75	1694,35	1894,25	3342,67
IL-6 (Trasporto)	pg/ml	2339,00	2645,80	1976,50	3802,0
TNF-α alfa (Controllo)	pg/ml	827,75	3255,25	463,75	665,25
TNF-α (Trasporto)	pg/ml	1081,30	1832,00	459,00	957,0
IFN-α (Controllo)	Presenza/N° Totale Animali	2/12	2/12	0/12	0/12
IFN-α (Trasporto)	Presenza/N° Totale Animali	6/36	6/36	2/36	0/36

I risultati ottenuti dai saggi citochinici evidenziano che in entrambi i gruppi vi è stata una risposta in IL-6 e TNF-α estremamente elevata rispetto alla soglia fisiologica dei 150 pg/ml (Amadori, dati non pubblicati) durante tutto il periodo di osservazione. Per quanto concerne la produzione di IFN-α endogeno, la risposta nei due gruppi è risultata perfettamente sovrapponibile nei primi due prelievi, con eguale percentuale di positivi. Successivamente, la frequenza di risposta positiva al terzo prelievo si è abbassata in entrambi i gruppi per poi azzerarsi in corrispondenza del quarto.

Discussione

I dati ottenuti indicano che sia la temperatura che l'umidità relativa rilevate in stalla sono risultate prossime ai valori considerati ideali per la categoria zootecnica testata.
Durante il trasporto la temperatura si è collocata, in media, appena al di sotto del limite critico per la categoria di animali trasportati (EFSA, 2004). Come atteso, si è registrato un suo regolare incremento dalle prime ore del mattino a quelle di metà pomeriggio, causato dall'innalzamento della temperatura ambientale esterna. Le variazioni di umidità relativa durante il tempo di trasporto sono state particolarmente evidenti ed attribuibili al cambiamento delle condizioni climatiche esterne delle zone attraversate dall'automezzo
La prova svolta ha evidenziato l'assenza di un effetto attribuibile al trasporto sui parametri immunologici saggiati; infatti sia i soggetti trasportati che quelli di controllo hanno mostrato andamenti quasi sovrapponibili nell'evoluzione della concentrazione sierica di Lisozima, Aptoglobina, Complemento, Battericidia (parametri di immunologia clinica) e dei livelli citochinici. Si tenga presente a tale proposito che i parametri di immunologia clinica sono idonei a rappresentare l'impatto di *stress* a carattere subacuto-cronico, della durata di giorni o settimane. I dati vanno pertanto analizzati in un opportuno arco temporale. In particolare, i valori persistentemente elevati di Lisozima sono probabilmente riferibili alle conseguenze della sintomatologia diarroica manifestatasi nei giorni antecedenti al trasporto.
Complemento e Battericidia hanno presentato, sia nel gruppo Controllo che in quello Trasporto, i valori più elevati al secondo prelievo ed un significativo decremento (all'interno però del *range* normo-fisiologico) al terzo prelievo, in funzione probabilmente della reazione di adattamento alle nuove condizioni ambientali caratterizzate tra l'altro da cospicue variazioni di temperatura ed umidità relativa dopo il trasporto (Fig. 1 e 2).
I risultati ottenuti dai saggi citochinici evidenziano un'elevata risposta sia in IL-6 che in TNF-α prima del trasporto, con concentrazioni superiori ai livelli fisiologici in ambedue i gruppi,

riferibili, con buona probabilità alle conseguenze della sintomatologia diarroica sopra ricordata. A tale condizione si sovrappone la fisiologica regolazione dei livelli di citochine nella fase post-svezzamento, correlata al pieno adattamento al nuovo regime alimentare e ai corrispondenti livelli di accrescimento ponderale (Candotti et al., 2009). Per quanto concerne la produzione di IFN-α, la risposta nei due gruppi è risultata perfettamente sovrapponibile nei primi due prelievi, con eguale percentuale di campioni positivi. Successivamente, la frequenza di risposta positiva al terzo campionamento si è abbassata in entrambi i gruppi per poi azzerarsi in corrispondenza del quarto. Si tenga presente che IFN-α è fisiologicamente assente nel siero di suini non sottoposti a *stress* di natura infettiva o non-infettiva (Amadori, 2007).

Conclusioni

I risultati ottenuti in questa prova preliminare permettono di concludere che il trasporto di lunga durata di suinetti nel rispetto delle norme stabilita dal Reg. 1/2005 non determina, nelle condizioni microclimatiche testate, alterazioni evidenti della risposta immunitaria innata. Ulteriori prove di trasporto effettuate in condizioni climatiche differenti potranno contribuire a chiarire l'effetto di *stress* non infettivi (trasporto) sulla risposta immunitaria innata del suino.

Bibliografia

Amadori M. (2007) "The role of IFN-α as homeostatic agent in the infiammatory response: a balance between danger and response?" J Interferon Citokyne Res. **27**, 181-189.

Asai T., Okada M., Ono M., Irisawa T., Yokomizo Y., Sato S. (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.

Candotti P., Rota Nodari S., Razzuoli E., Dotti S., Amadori M. (2009) "Verifica degli effetti flogistici dello svezzamento precoce nel suinetto e loro modulazione mediante somministrazione di interferon-alfa." Atti XXXV Meeting Annuale SIPAS, Modena 12-13 Marzo, 293-299.

Dorn W., Mehlhorn G., Klemm C. (1980) "Blood bactericidal activity in calves." Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin. **34**, 635-650.

EFSA (2004) "Standards for the microclimate inside animal road transport vehicles". *The EFSA Journal* (2004), 122, 1-25,

Grenett HE., Danley DE., Strick CA., James LC., Otterness IG., Fuentes N., Nesbitt JE., Fuller GM. (1991) "Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in Escherichia coli." Gene. **101,** 267-271.

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.

Meager A. (1987) "Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization." In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing, AJH. "Lymphokines and interferons, a practical approach" Oxford: IRL Press Limited, 129-147.

Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966) "Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia." J Exp Med. **124**, 921-952.

SAS (1996). SAS/STAT User's Guide, 4th Ed., SAS Institute Inc., Cary, NC.

Seyfarth M. (1976) "Komplementtitration" In: "Immunologische Arbeitsmethoden" Ed: H. Friemel. VEB Gustav Fischer Verlag.,145-148.

BIOATTIVAZIONE E QUALITÀ AMBIENTALE NELL'ALLEVAMENTO DEL SUINO CONSUNTIVO DI TRE ANNI D'ATTIVITÀ

BIOACTIVATION AND ENVIRONMENTAL QUALITY IN PIG FARMING A THREE YEARS OUTLINE

SALA V.[1], GUSMARA C.[1], BRIGNOLI P.[2], CABRINI L.[2], MUSELLA C.[3]

[1]Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria Università di Milano;
[2]Eurovix s.r.l. – Cazzago S. Martino (BS); [3]Medico Veterinario

Parole chiave: bioattivazione, qualità ambientale, allevamento del suino.
Key words: bioactivation, environmental quality, pig farming

Riassunto. Sono riportati i dati finali di un lavoro triennale di sperimentazione sulla possibilità di migliorare lo stato sanitario dei suini in allevamento intensivo attraverso la qualificazione ambientale ottenuta grazie alla bioattivazione. Sono stati considerati rilievi e diagnosi eseguite nel periodo di applicazione del trattamento (giugno 2006 – ottobre 2008), soprattutto per quanto riguarda i livelli di circolazione dei patogeni più frequentemente interferenti sulla produttività del suino tradizionale e la concentrazione ambientale del gas ammoniacale. I risultati sono stati particolarmente positivi per quanto riguarda salmonelle e *Mycoplasma hyopneumoniae*, nonostante un periodo di sovraffollamento dell'allevamento conseguente ai provvedimenti restrittivi per un'epidemia di malattia vescicolare del suino.

Abstract. The results of a three years trial about the use of bioactivation for the enhancement of the pig sanitary status through environmental management are reported. The farm remarks on the air ammonia concentration and the serological screenings performed along the application of the bioactivation protocol have demonstrated the value of the treatment in the reduction of the salmonella and *M. hyopneumoniae* infections. This effect has been maintained despite a long pause in the farm animals' disposal for a territorial blocking consequent to an epidemic of swine vesicular disease.

INTRODUZIONE

Attraverso la bioattivazione con miscele batterico-enzimatiche è possibile migliorare la qualità dell'ambiente d'allevamento, evitando la formazione di sostanze effettivamente dannose per gli operatori e gli animali, o anche semplicemente fastidiose per la loro tranquillità; il processo mira a una trasformazione positiva nell'attività di maturazione dei liquami e ottiene, come risultato immediatamente percepibile, un miglioramento della qualità dell'aria.
Infatti, a una diminuzione degli inquinanti nei locali di allevamento, corrisponde una minor percepibilità dell'insediamento zootecnico sul territorio circostante, con intuibili vantaggi sociali in conseguenza della diminuzione dell'inquinamento olfattivo; inoltre, a ciò si associa una minor biodisponibilità dell'azoto conseguente allo spaglio dei liquami e quindi una ridotta eutrofizzazione dei terreni agricoli.
L'applicazione di queste tecnologie nella gestione sanitaria dell'allevamento e il monitoraggio sperimentale della loro efficacia hanno preso le mosse dal riscontro della progressiva perdita

di efficacia dei tradizionali interventi di controllo e prevenzione sulle perdite produttive riportabili alle sindromi polifattoriali; inoltre, l'esperienza di questi anni ci ha convinto che solo un effettivo stato di "benessere" dell'animale rispetto all'ambiente in cui vive rappresenta l'unica soluzione atta a potenziarne le rese produttive e le capacità immunitarie.
Le basi della bioattivazione coincidono con quelle degli ecosistemi batterici, nei quali tutti i microrganismi hanno un ruolo preciso e integrato: l'evoluzione delle conoscenze ha permesso di migliorarne l'applicazione pratica, modulando le interazioni tra le diverse popolazioni di microrganismi attraverso l'aggiunta di enzimi di origine batterica e prodotti derivati da altre colture microbiche.
I microrganismi bioattivatori bilanciano i processi degradativi della sostanza organica, riducendone la disponibilità nutrizionale per i patogeni, dei quali diventano perciò competitori biologici; il risultato più immediato ed evidente è la salubrità dell'ambiente di lavoro e allevamento, ottenuta attraverso la riduzione del volume dei liquami e l'aumento della loro fluidità. Attraverso i bioattivatori, è dunque possibile migliorare qualità dell'aria, polverosità ambientale, fecalizzazione e, in ultima analisi, controllare la circolazione dei microrganismi patogeni.
I trattamenti si eseguono distribuendo bioattivatori in polvere sulle superfici calpestate dagli animali, oppure miscelandoli direttamente nei liquami, o ancora nebulizzandoli in forma liquida; i migliori risultati si ottengono associando con continuità le diverse forme di trattamento e potenziandole attraverso la somministrazione di integratori alimentari idonei a costituire un substrato favorevole ai microrganismi bioattivatori.
In una fase di oggettiva difficoltà dell'intero comparto agro-zootecnico, e di quello suinicolo in particolare, una delle più importanti banche della bassa bresciana, la Banca del Credito Cooperativo di Pompiano e della Franciacorta, ha deciso di favorire, attraverso un apposito finanziamento, lo sviluppo tecnologico delle aziende suinicole del distretto di Orzinuovi, (in 18 comuni è presente il 23% del patrimonio suinicolo provinciale); quanto presentato in questa nota è il risultato del lavoro in una di queste aziende, nella quale è stato applicato, per la prima volta e per un triennio, il sistema di bioattivazione Micropan® prodotto e commercializzato dalla ditta Eurovix, che opera da diversi anni nel settore delle bio-tecnologie applicate all'ambiente.
Nel periodo di osservazione sperimentale è stata compresa, per ragioni evidentemente contingenti, l'emergenza sanitaria della malattia vescicolare, che è stata particolarmente intensa e perdurante nel comprensorio bresciano; ciò ha permesso di valutare il trattamento anche nelle condizioni di sovraffollamento aziendale, conseguente ai provvedimenti di sequestro e blocco delle movimentazioni.
Accanto ai rilievi più consolidati per il rilievo dei gas ambientali (NH_3 ,CH_4, H_2S), è stata utilizzata la sierologia sugli animali per il monitoraggio dell'andamento delle infezioni aziendali.

MATERIALI E METODI

Azienda e animali
Le prove sono state condotte in un'azienda suinicola a ciclo chiuso completo di 1000 scrofe in produzione, situata nel comprensorio bresciano; il ciclo è indirizzato all'allevamento del suino pesante tradizionale e si svolge in più siti: il principale comprende strutture di gestazione, sale parto, svezzamento e magronaggio, mentre l'ingrasso è in un altro nucleo, situato a qualche chilometro di distanza.
La rimonta è assicurata da un nucleo di scrofe GP, mantenute in una piccola azienda satellite; piano vaccinale e programmazione delle medicazioni strategiche sono gestiti secondo i

canoni tradizionali per questo tipo di produzione.
Lo screening diagnostico iniziale ha rilevato una situazione instabile attiva nei confronti di PRRSV, nonché la circolazione di batteri enteropatogeni nello svezzamento e di opportunisti respiratori nella fase di messa a terra; le forme cliniche di più frequente comparsa consistono, infatti, in episodi ricorrenti di patologie enteriche dello svezzamento (malattia degli edemi ed enterocolite salmonellare) e di malattia respiratoria nel magronaggio.

Trattamento
Durante tutto il periodo considerato, è stato applicato il sistema di bioattivazione Micropan® prodotto dalla stessa ditta, che comprende due bioattivatori (Micropan® polvere e Micropan® soluzione) e un prodotto naturale di origine vegetale (Biolife®) da aggiungere alla razione alimentare. Micropan® polvere è stato distribuito sulle pavimentazioni, in ragione di 0,5 Kg per 100 mq ogni 15 giorni mediante spargimento manuale, mentre Micropan® soluzione è stato aerosolizzato nell'ambiente di stabulazione, mediante impianto computerizzato, in ragione di 1 litro ogni 100 mq al mese (3 irrorazioni giornaliere della durata di 20 secondi, previa diluizione in acqua alla concentrazione del 3-5%); Biolife è stato invece aggiunto quotidianamente alla razione, in ragione di 500 g/t di mangime.
I bioattivatori contengono enzimi (cellulasi, lipasi, pancreasi, proteasi, α-amilasi, β-amilasi, emicellulasi, pectinasi e β-glucanasi), microrganismi selezionati in processi di fermentazione controllata con prevalenza di *Bacillus* spp., principi attivi di *Fucus laminariae*, sali minerali di calcio e magnesio, alghe della specie *Lithothamnium calcareum*, sali minerali di mordente e dolomia, estratti vegetali e agar colturale.
Biolife® è invece un composto su base vegetale, ottenuto mediante processi di fermentazione controllata, che svolge una funzione di equilibratore organico attraverso il suo naturale contenuto in polisaccaridi, fattori enzimatici, fattori vitaminici e aminoacidi essenziali, che migliorano il bilancio funzionale della microflora intestinale, prevengono la replicazione delle specie batteriche dannose e la formazione di tossine.
I trattamenti sono stati eseguiti nei reparti di gestazione, sale parto e magronaggio; la migliore utilizzazione dei principi alimentari riduce l'emissione fecale di composti ammoniacali, con evidenti benefici sull'impatto ambientale e sull'inquinamento olfattivo.

Rilievi ambientali
È stata rilevata, con scadenza quadrimestrale, la concentrazione di ammoniaca (NH_3) applicando un metodo chimico (Drager Pac III) che prevede l'impiego di apposite fiale poste per un tempo prestabilito in punti fissi delle sale di stabulazione.

Prelievi ematici e tecniche diagnostiche
I prelievi ematici hanno riguardato scrofette (12 capi), scrofe (35 capi, suddivisi tra primipare, secondipare e terzipare), svezzati (45 capi) e magroni (45 capi); è stata considerata l'evoluzione temporale delle sieroconversioni per PRRSV nella scrofaia (scrofe e scrofette da rimonta) e per *M. hyopneumoniae* e *Salmonella* spp. nella produzione, utilizzando il sistema ELISA della ditta Idexx.
L'andamento dei campionamenti, inizialmente programmati con cadenza quadrimestrale, è stato inevitabilmente condizionato dal periodo di blocco dell'azienda conseguente alle misure restrittive territoriali d'emergenza per la malattia vescicolare; questo ha motivato l'intervallo temporale tra il prelievo 4 (settembre 2007) e 5 (aprile 2008).
I campioni ematici sono stati rapidamente portati in laboratorio, dove l'emosiero è stato estratto mediante centrifugazione, diviso in due aliquote di ugual volume (per eventuali ripetizioni o altri accertamenti) e stoccato in congelatore fino al momento delle diagnosi.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Tra i risultati ottenuti, che saranno presto oggetto di una pubblicazione, riferiamo qui la valutazione delle sieroprevalenze per micoplasmi e salmonelle, considerate indicative della situazione ambientale per quanto riguarda qualità dell'aria e microbizzazione di derivazione fecale, nonché il monitoraggio dell'andamento di PRRSV; di seguito, riportiamo gli andamenti della concentrazione ambientale di ammoniaca.

Sieroprevalenze

PRRSV. Nella tabella 1 sono riportate le sieroprevalenze medie, per tipologia di animali esaminati (scrofe, scrofette e svezzati) ottenute nei diversi campionamenti; nella scrofaia, solo in un accertamento (giugno '08) la sieroprevalenza ha superato la soglia critica di stabilità (>90%) che garantisce una riduzione importante della circolazione virale.

Il rischio di reinfezione è evidente nei prelievi di settembre '07, aprile '08 e ottobre '08; la sieroprevalenza delle scrofette è uniformemente elevata e indica il contatto con il virus durante i periodi di crescita e selezione.

La sieroprevalenza negli svezzati è sistematicamente bassa, con soglie altamente critiche nel periodo ottobre '06 – marzo '07; è necessario ricordate che i problemi sono correlabili soprattutto ai sieronegativi (ancora recettivi all'infezione nelle fasi successive alla diagnosi) e che, quindi, tanto minore è la sieroprevalenza, tanto maggiore il rischio.

Data	% pos. scrofaia	% pos. scrofette	% pos. svezzati
Giugno 2006	66,4	100,0	62,2
Ottobre 2006	80,6	100,0	35,0
Marzo 2007	80,0	60,0	37,5
Settembre 2007	59,0	67,0	54,2
Aprile 2008	62,3	91,7	65,8
Giugno 2008	90,8	91,7	54,5
Ottobre 2008	56,5	100,0	67,5

Tabella 1. Sieroprevalenze medie per categoria e per data.

Le sierodiagnosi per *Mycoplasma hyopneumoniae* e salmonelle sono state regolarmente eseguite soltanto sui magroni, perché sono le infezioni di questa fase principalmente responsabili di forme cliniche correlate all'alterazione delle condizioni sanitarie e della produttività dei suini; i dati relativi sono riportati in tabella 2. Per salmonella sono state eseguite, a necessità, anche sierodiagnosi sulle scrofe, non riportate in termini numerici in questa relazione: le stesse hanno comunque sistematicamente attinto a livelli sieroprevalenza vicini al 100%.

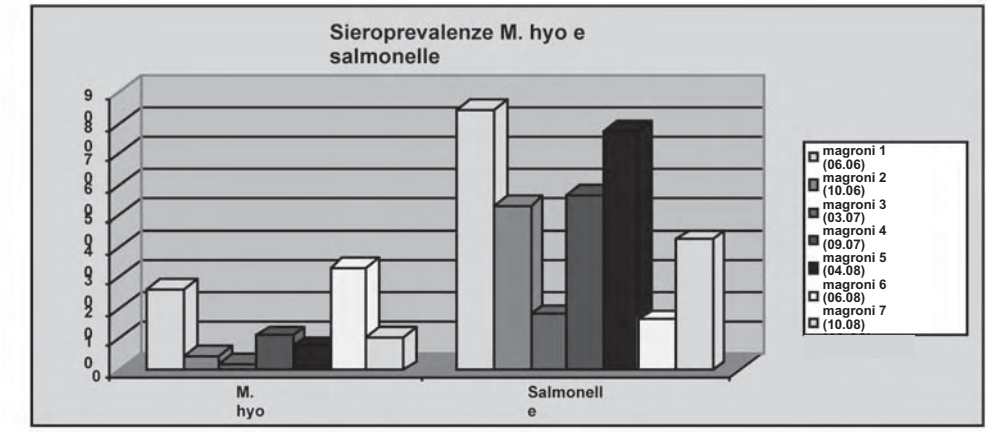
Mycoplasma hyopneumoniae. È stata rilevata una sieroprevalenza relativamente elevata all'inizio del periodo sperimentale; in seguito, l'azione del bioattivatore, ha determinato, in linea con i risultati già ottenuti in altre sperimentazioni e resi pubblici attraverso le riviste scientifiche, una diminuzione della sieropositività e quindi della circolazione.

Un nuovo aumento è stato osservato dopo il periodo di sovraffollamento; la sieroprevalenza di giugno '08 è la più alta dell'esperimento e indica, una volta di più, la correlazione diretta tra infezione micoplasmica e affollamento; l'aumento dopo due mesi dalla fine del periodo critico è spiegabile con la "lentezza" della risposta anticorpale, tipica dell'infezione micoplasmica. È comunque evidente che la ripresa del trattamento regolare ha nuovamente ridotto la circolazione del patogeno.

Salmonelle. Anche la circolazione delle salmonelle segue il medesimo schema evolutivo già descritto per micoplasma: ad una sieroprevalenza iniziale eccessivamente elevata (84,4%) ha fatto seguito una progressiva riduzione, fino al 18,2% del marzo '07; successivamente, e fino ad aprile '08, la circolazione è ripresa, raggiungendo quasi il livello iniziale. Ciò potrebbe dipendere, inizialmente (57% di settembre '07) dalla stagione estiva (con le temperature elevate, l'attenzione va aumentata) e in seguito dall'emergenza "vescicolare" che ha riportato le sieroprevalenze quasi al livello iniziale (77,5% di aprile '08); la ripresa regolare del trattamento ha determinato, come per micoplasma, una nuova riduzione delle positività.
L'interferenza della stagione estiva in questo allevamento è stata riconfermata dalla risalita rilevata a ottobre '08 (42,1%); è a questo punto evidente che salmonella è un problema aziendale consolidato: alle condizioni attuali d'impiego, la bioattivazione è efficace ma non risolutiva, ed esistono ancora sacche temporali e manageriali di aumento della circolazione. In situazioni di questo tipo, la bioattivazione del periodo di svezzamento potrebbe migliorare la situazione.

Gruppo	M. hyo	Salmonelle
magroni 1 (06.06)	26, 7	84,4
magroni 2 (10.06)	4,7	53,5
magroni 3 (03.07)	2,3	18,2
magroni 4 (09.07)	11,0	57,0
magroni 5 (04.08)	7,5	77,5
magroni 6 (06.08)	33,3	16,7
magroni 7 (10.08)	10,5	42,1

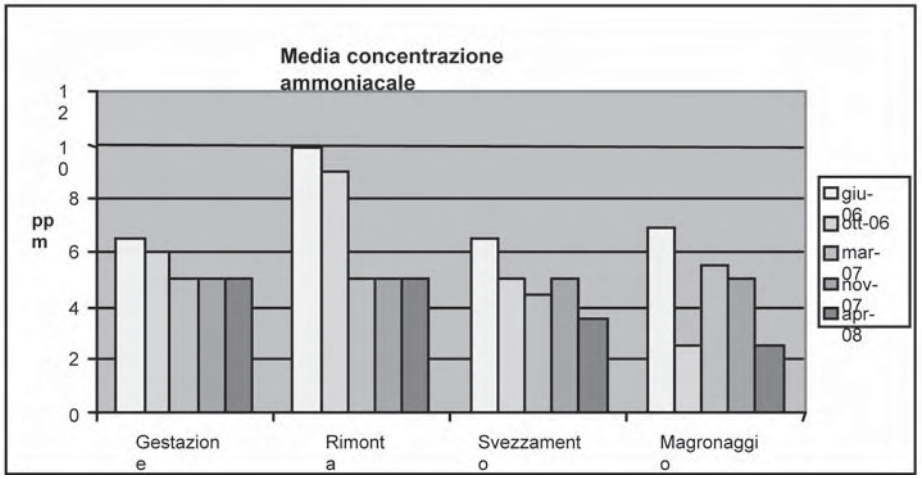
Tabella 2. Sieroprevalenze temporizzate per *M. hyopneumoniae* e salmonelle nei magroni.
Grafico 1. Sieroprevalenze per M. hyopneumoniae e Salmonella spp.



Biogas ambientali (ammoniaca)
I rilievi ambientali hanno mostrato una riduzione progressiva e generalizzata della concentrazione di gas ammoniacale nei ricoveri sottoposti a trattamento, confermando quanto già osservato in altre precedenti prove; nel primo rilievo pre-trattamento, eseguito in giugno, con temperature esterne e ventilazione elevate, la concentrazione ammoniacale è stata ovviamente ridotta. A fronte di una logica attesa di aumento dei valori in conseguenza della stagione autunno-invernale, il trattamento ha invece mantenuto tale livello per tutta la durata della sperimentazione; i risultati sono espressi nel seguente grafico 1.

Nello specifico dell'azienda in prova, è possibile che il trattamento di bioattivazione abbia sortito effetti maggiori come conseguenza della prima applicazione a un sistema ad elevata criticità; solo così possono trovare spiegazione le riduzioni assai consistenti della contaminazione ammoniacale riscontrate in tutte le fasi produttive, che hanno raggiunto soglie minime nei locali a maggiore criticità, come i ricoveri delle scrofette da rimonta o il magronaggio.

Grafico 1. Valori medi di ammoniaca rilevati nei diversi locali dell'allevamento.



CONCLUSIONI

Il trattamento di bioattivazione ha sortito buoni effetti sulle infezioni batteriche (salmonella ne è l'esempio) e micoplasmiche; chiaramente, trattandosi di un sistema di miglioramento della qualità ambientale, la sua efficacia è strettamente dipendente dall'applicazione di buone pratiche operative in quest'ambito.

Non è possibile, ad esempio, pretendere, come abbiamo visto sperimentalmente, di risolvere con la bioattivazione il problema del sovraccarico delle strutture di allevamento, soprattutto se eccessivo, come nell'emergenza "vescicolare"; in condizioni di applicazione regolare e management corretto, la bioattivazione può rappresentare un "valore aggiunto" da gestire per migliorare lo stato di benessere dei suini e quindi la loro produttività.

Non è stato ottenuto, e non era prevedibile, vista la natura dell'infezione e il meccanismo d'azione dei bioattivatori, il controllo della PRRS, almeno in termini di quantità di virus circolante; sono in fase di analisi i parametri dell'immunità aspecifica, che indicano lo stato di reattività organica degli animali sottoposti al trattamento, e che diranno una parola definitiva riguardo al loro stato organico, non soltanto nei confronti delle infezioni, ma anche verso tutti gli stimoli esogeni in quanto tali.

È invece da ora certamente acquisita, come anche altri studi hanno indicato, l'efficacia nel controllo delle complicanze batteriche, che rappresentano certamente la principale fonte di problematiche cliniche e perdite economiche in questo tipo di produzione.

Per concludere, è necessario sottolineare che le concentrazioni ambientali di ammoniaca, che rappresentano un serio problema per la salute respiratoria degli animali, si sono sempre mantenute nei limiti di tollerabilità per tutto il periodo di trattamento.

Esistono quindi tutti i presupposti per considerare il sistema di bioattivazione Micropan® uno strumento efficace nella qualificazione ambientale, nel potenziamento della reattività dei suini allevati e quindi nel controllo del danno sanitario e produttivo.

Bibliografia

- Aarnink A. J. A., Schrama J. W., Heetkamp M. J. W., Stefanowska J., Huynh T. T. T. (2006) "Temperature and body weight affect fouling of pig pens". J. Anim. Sci. 84, 2224 – 2331.
- Chiumenti R., Donantoni L. (1991) "La stabilizzazione per via aerobica: prove sperimentali su liquami suini. Rivista di Ingegneria Agraria". 12, 287 – 301.
- Done S. H., Chennells D. J., Gresham A. C., Williamson S., Hunt B., Taylor L. L., Bland V., Jones P., Armstrong D., White R. P., Demmers T. G., Teer N., Wathes C. M. (2005) "Clinical and pathological responses of weaned pigs to atmospheric ammonia and dust". Vet. Rec. 157, 71 – 80.
- Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Ostanello F., Sala V (2006) "Correlation between severity of Mycoplasma hyopneumoniae lung lesions and carcass quality in Italian heavy weight pigs". Proceedings of the 19th Congress of the International Pig Veterinary Society, Copenhagen, July 16–19, p. 217.
- Drummond J. C., Curtis S. E., Simon J., Norton H. V. (1980) "Effect of aerial ammonia on growth and health of young pigs". J. An. Sci. 50 (6), 1085 – 1091.
- Duchaine C., Grimard Y., Cormier Y. (2000) "Influence of building maintenance, environmental factors, and seasons on airborne contaminants of swine confinement buildings". AIHAJ 61 (1), 56 – 63.
- Gallmann E., Brose G., Hartung E., Jungbluth T. (2001) "Influence of different pig housing systems on odour emissions. Water science and technology". 44 (9), 237 – 244.
- Jones J. B., Wathes C. M., Webster A. J. F. (1997) "Behavioural responses of pigs to atmospheric ammonia. In Livestock Environment (V 2)". ed. R. W. Bottcher and S. J. Hoff. Am. Soc. Agr. Eng., St. Joseph, Michigan. p. 875 – 882.
- Kuroda K., Hanajima D., Fukumoto Y., Suzuky K., Kawamoto S., Shima J., Haga K. (2004) "Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes". Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (2), 286 – 292.
- Merril L., Halverson L. J. (2002) "Seasonal Variation in Microbial Communities and Organic Malodor Indicator Compound Concentration in Various Types of Swine Manure Storage Systems". J. Environ. Qual. 31, 2074 – 2085.
- Möller H., Sommer S., Ahring K. (2004) "Biological degradation and greenhouse gas emission during pre storage of liquid animal manure". J. Environ. Qual. 33, 27 – 36.
- O'Shaughnessy P. T., Achutan C., Karsten A. W. (2002) "Temporal Variation of Indoor Air Quality in an Enclosed Swine Confinement Building". J. Agr. Saf. Health. 8 (4), 349 – 364.
- Ostanello F., Dottori M., Gusmara C. Leotti G., Sala V. (2006) "Utilizzo del punteggio polmonare (lung score) nei suini italiani: validazione del metodo, valutazione della prevalenza e dei fattori di rischio associati all'infezione da Mycoplasma hyopneumoniae". Large An. Rev. 12 (2), 13 – 21.
- Sala V., Brignoli P. (2006) "Organizzazione e verifica di un programma integrato di tutela ambientale nella prevenzione delle sindromi polifattoriali del suino. Nota preliminare". Atti SIPAS, 353-356.
- Velthof G. L., Nelemans J. A., Oenema O., Kuikman P. J. (2005) "Gaseous Nitrogen and Carbon Losses from Pig Manure Derived Different Diets". J. Env. Qual. 34, 698 – 706.

EFFETTO DI UN PRODOTTO MULTI-FUNZIONALE SULLE PERFORMANCE DI SUINETTI ALIMENTATI CON UN MANGIME CONTAMINATO NATURALMENTE DA MICOTOSSINE

EFFECT OF A MULTI-FUNCTIONAL CONCEPT BASED PRODUCT ON PERFORMANCE OF PIGLETS FED WITH A MYCOTOXINS NATURALLY CONTAMINATED FEED

SCHWARZER K.[1], MAFFEZZOLI D.[2]

[1]*NUTRI-AD, BELGIUM* k.schwarzer@nutriad.net
[2]*NUTRI-AD, ITALIA* d.maffezzoli@nutriad.net

Parole chiave: Micotossine, suinetti, glucani, performance
Key words: Micotoxins, piglets, glucan, performance

Riassunto: In quest'esperimento si è voluto valutare l'effetto che alcune micotossine prodotte da Fusarium (Vomitossina, Zearalenone, tossina-T2, Fumonisina e l'Ocratossina) e l' Aflatossina B1 hanno sulle performance dei suini e su alcuni organi e come poterne ridurre l'impatto negativo con l'uso di un captante a base di glucani.
La prova è stata eseguita utilizzando 20 suini di sesso femminile dal peso medio di 17 kg divisi in tre gruppi. Un gruppo di controllo negativo (senza micotossine) un gruppo alimentato con un mangime naturalmente contaminato da micotossine ed un terzo con lo stesso mangime contaminato più l'aggiunta (1,5 Kg/ton) di uno specifico captante per micotossine.
Gli accrescimenti del gruppo di suini alimentati con mangime contaminato sono stati penalizzati del 39,7% rispetto il controllo negativo, mentre il gruppo di suini con l'aggiunta di captante del 25,9%. E' stato misurato anche il valore d'ALT (alanina amino transferasi) e d'Estrogeni a livello ematico. I valori d'ALT e d'Estrogeni erano rispettivamente di 69 (iu/ml) e 27 (pg/ml) nel gruppo di suini alimentati con mangime contaminato, mentre nel gruppo di suini alimentati con mangime contaminato più il captante, i valori erano rispettivamente di 57 (iu/ml) e 20 (pg/ml).

Abstract: In this trial we have study the impacts of some Fusarium mycotoxins (Vomitoxin, Zearalenon, T2-toxin, Fumonisin and Ochratoxin) and Aflatoxin B1 on pigs performance and some organs, and how eventually decrees the negative impact with the inclusion of a glucan mycotoxins binder.
Twenty pigs (female) have been used with an average weight of 17 Kg and split into three groups. Control diet without mycotoxins, a group receiving mycotoxins contaminated diet and a group receiving mycotoxins contaminated diet with the inclusion of 1,5 (kg /ton) mycotoxins binder.
The body weight of the pigs was reduced in group receiving contaminated feed with 39,7 % versus pigs receiving the control diet. The inclusion of a mycotoxins binder in the contaminated diet diminished the negative impact on body weight (25,9%).
The ALT (alanine amino transferase) end Estrogen in the blood of pigs fed with the contaminated diet were respectively 69 (iu/ml) and 27 (pg/ml), whereas the value of pigs fed with the contaminated diet and the inclusion of mycotoxins binder were 57 (iu/ml) and 20 (pg/ml).

INTRODUZIONE

Le performance di un allevamento suino possono venire compromesse significativamente se gli alimenti somministrati contengono micotossine.
I cereali contaminati da Fusarium utilizzati per l'alimentazione dei suini possono contenere diversi metaboliti tossici come Vomitossina, Zearalenone, tossina-T2 e Fumonisina.

Mangimi contaminati con Vomitossina provocano nei suini una riduzione dell'ingestione dell'alimento più o meno marcata a secondo del livello di micotossina presente con conseguente riduzione delle performance produttive.
La Vomitossina è anche causa di lesioni a livello del tratto gastro-intestinale .
Le micotossine hanno anche un effetto immuno-depressivo.

Lo Zearalenone ha invece un effetto negativo sulle performance riproduttive dei suini. Le scrofette in particolare e le scrofe sono suscettibili a questa tossina, manifestando arrossamenti vulvari e spesso anche prolassi anali e vaginali.
Gli alimenti contaminati da Zearalenone possono alterare il ciclo sessuale delle scrofe che porta inevitabilmente ad una riduzione dei suinetti nati.
Nei verri lo Zearalenone può influenzare negativamente le qualità dello sperma riducendone il volume e anche la motilità degli spermatozoi.

Le Aflatossine provocano intossicazione epatica. A bassi dosaggi possono ridurre l'ingestione di alimento causando un calo degli accrescimenti. Hanno anche un effetto immuno-depressivo.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta in Spagna presso l'Istituto Agro Test di Saragozza (Spagna) ed ha coinvolto 20 suini di sesso femminile dal peso vivo medio di circa 17 kg.
I suini sono stati divisi in tre gruppi:

- Gruppo di controllo dieta normale senza micotossine (7 suini)
- Gruppo alimentato con mangime contaminato da micotossine (6 suini)
- Gruppo alimentato con mangime contaminato da micotossine con l'aggiunta di 1,5 kg \ ton di captante (UNIKE® Plus)

La prova ha avuto inizio il 2 Giugno 2009 e ha avuto termine il 9 luglio. Nella prima settimana d'acclimatazione i suini hanno ricevuto la stessa dieta a base di mais, orzo, farina di estrazione di soia, gluten feed, pisello proteico, olio di soia, cloruro di sodio, calcio carbonato, fosfato bicalcico e melasso di barbabietola.
L'analisi del mangime è la seguente:

Umidità 13 %
Proteina greggia 15,7 %
Fibra greggia 3,3%
Grassi greggi 2,2 %
Ceneri gregge 7,9%
Amidi 25,2%
Calcio 0,89%

Il contenuto di micotossine del mangime era il seguente e la contaminazione è stata ottenuta utilizzando materie prime naturalmente contaminate:

- Zearalenone 596 ppb
- Vomitossina 1560 ppb
- Aflatossina B1 1 ppb
- Fumonisina 1800 ppb
- Tossina T2 22 ppb
- Ocratossina in tracce

L' analisi statistica è stata eseguita con ANOVA, Wilcoxon Signed Ranks Test.

RISULTATI

Tabella n° 1 – Pesi corporei dei suini all'inizio e alla fine della prova e indici di conversione
Table n°1- Initial and final body weight and feed conversion ratio of pigs

	Peso iniziale (Kg)	**Peso finale (Kg)**	**Indici di conversione**
Controllo negativo	16,7	35,5	2,31
Alimento contaminato	15,75	21,4	4,68
Alim.cont. con captante	17	26,3	3,08

Grafico n°1- Valori ematici di ALT (iu/l) (Alanina amino transferasi)
Graphic n°1 – Blood value of ALT (iu/l) (Alanine amino transferase)

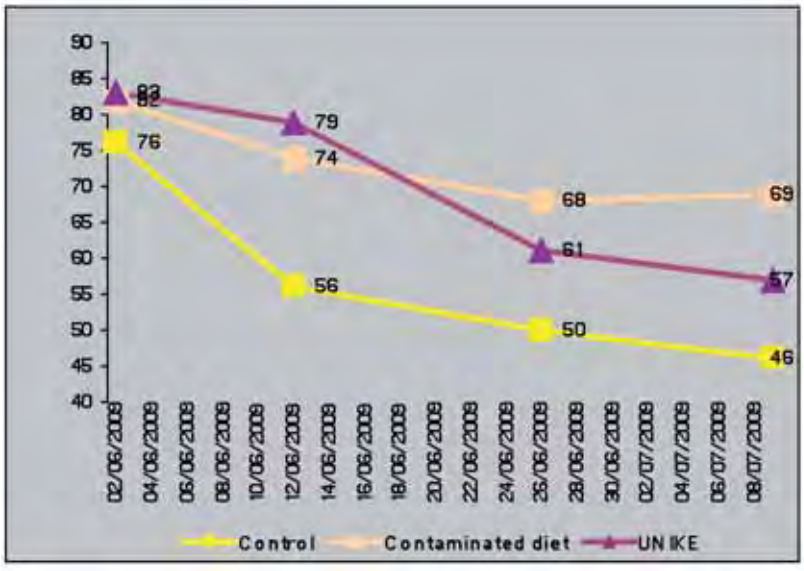
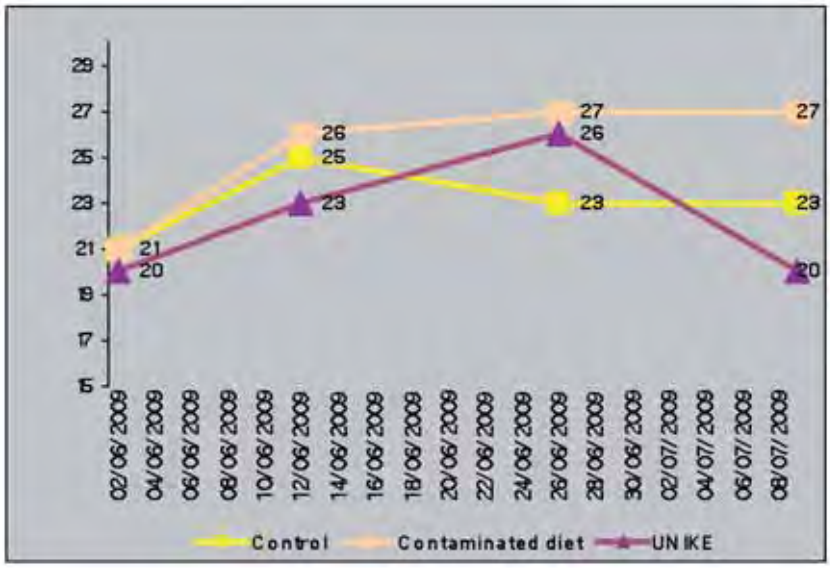


Grafico n°2- Valori ematici degli Estrogeni (Pg\ml)
Graphic n°2 – Blood value of Estrogen (Pg\ml)



DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Sebbene i dati raccolti non avessero raggiunto la significatività statistica, il peso corporeo del gruppo di suini che sono stati alimentati con il mangime contaminato era del 39,7 % inferiore rispetto al peso del gruppo di controllo negativo. Mentre il gruppo di suini alimentato con mangime contaminato più l'aggiunta di captante (UNIKE® Plus) ha limitato le perdite e la differenza percentuale rispetto al gruppo di controllo negativo è stata del 25,9 %.
L' indice di conversione alimentare come si può evincere dalla tabella n° 1, è stato particolarmente sfavorevole (4,68) per il gruppo di suini alimentato con il mangime contaminato, mentre il gruppo di suini alimentato con mangime contaminato più l'aggiunta del captante ha avuto un indice di conversione migliore (3,08).
Nel grafico n° 1 sono stati riportati i valori dell'enzima ALT (alanina amino tranferasi) che è un indice del grado di danneggiamento epatico.
Al termine della prova il valore medio d'ALT nel sangue dei suini del gruppo di controllo negativo era 46 (iu/ml),
mentre per i suini alimentati con mangime contaminato il valore era di 69 (iu/ml) e i suini alimentati con lo stesso mangime contaminato ma con l'aggiunta del captante avevano un valore d'ALT di 57 (iu/ml).
Nel grafico n° 2 i valori degli estrogeni nel sangue dei suini alimentati con mangime contaminato rimangono elevati per tutto il periodo della prova se confrontati con il gruppo di controllo e il gruppo del mangime contaminato più captante.

Le tossine presenti nel mangime possono effettivamente pregiudicare gli accrescimenti dei suini ed alterare il funzionamento d'alcuni organi come suggerito dall'analisi del sangue effettuata sui suini.

Per limitare al massimo il rischio micotossine è fondamentale adottare tutti gli accorgimenti possibili cominciando da buone pratiche agronomiche e di stoccaggio delle materie prime. Spesso questo non è sufficiente per scongiurare il rischio tossine.
L'inclusione d'opportuni captanti può ridurre l'impatto negativo delle micotossine e ridurne così gli effetti negativi sulle performance.

BIBLIOGRAFIA

G.T. Edds, D.V.M.,1973 "Acute Aflatoxicosis: A Review," Journal of the American Veterinary Medical Association, 162:304-309

1. Diener, U.L., R.J. Cole, T.X. Sanders, G.A. Payne, L.S. Lee, and M.A. Klich. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by Aspergillus flavus. Ann. Rev. Phytopathol. 25:249-270.

2. Comunicaciones INTA 2003

3. IX Jornadas de porcino de la U.A.B. febrero 2006

4. Anadon, A.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Fernández-Cruz, M.L. (1995) Revue de Médecine Vétérinarie 146:533-548

5. Busquet, M. (2006) Las micotoxinas como sustancias indeseables en la alimentación porcina. Anaporc 27: 24-31.

6. Chang,K.; Kart, H.J.; Mirocha, C.J. (1979) American Journal of Veterinary Research 40. 1260-1267.

7. Ettiene y Dourmad, (1994) Livestock Production Science 40:99-113.

8. José Miguel Soriano del Castillo. Micotoxinas en alimentos (Ed. Diaz de Santos)

9. Isabelle P. Oswald 2007. Efectos inmunosupresores de las micotoxinas en el cerdo. Suis 35: 14-20.

10. Grandia J., Menjón R, Falceto M.V., Bascuas, J.A. Zearalenona (ZEN), método rápido de diagnóstico. Producción animal 234: 60-64.

11. Veterinaria.txt. Origen y prevención de las micotoxicosis. Ediporc 111: 6-14.

12. Laboratorios Reveex de Venezuela C.A. Micosis y micotoxicosis en avicultura.

13. Denny J.Meyer – John V.Hervey. Medicina laboratorial veterinaria.Interpretación y diagnosis (3a edición).

14. Martín Rillo. Efecto del aparato genital de la primeriza sobre la productividad de la cerda. www.providesa.com

15. Santiago Martín Rillo, Carmen de Alba Romero, Rafael Cidoncha y Alfredo Romero. TAMAÑO DE CAMADA Y PENETRACIÓN DEL CATÉTER EN CERDAS NULÍPARAS. www.providesa.com

16. F.Martinat-Botté. UMR 6175-CNRS. Université de Tours.Haras Nationaux PRC, 37380 Nouzilly. Francia XI Simposium Internacional "Dr. Santiago Martín Rillo" 31/3-1/4 de 2005. Zaragoza (España) http://www.avancesentecnologiaporcina.com

17. Alberto Gimeno. Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. http://www.engormix.com

18. D. Jorge Venturino y Dr. Pablo Alvarez. Biofarma S.A. Argentina. Micotoxinas y silos bolsa. http://www.engormix.com

19. Sergio Quispe y Susana Revollo. Unidad Biología Molecular: Univ. Mayor de San Andrés, Bolivia. Estudios de contaminación con aflatoxinas producidas por Aspergillus flavus en la castaña y el maní. http://www.engormix.com

20. Sector porcinos de la estación experimental agropecuaria pergamino. Micotoxinas: Zearalenona, la peor de todas. http://www.inta.gov.ar/

21. Fuente: Ramón Cos. Super´s Diana- TSC. Utilización de secuestrantes de micotoxinas en el pienso. www.3tres3.com

22. Fuente: Ester Vinyeta Puntí. Grup Baucells Alimentació. Esporc.España. Utilización de secuestrantes de micotoxinas en el pienso. www.3tres3.com

23. Martha Diaz de Ackermann, Silvia Pereyra, Silvina Stewart, Juan Mieres (INIA-Uruguay). Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. http://www.engormix.com

24. Ing. José.E Ferrer (Agranco corp.). Importancia de las micotoxinas en cerdos. http://www.engormix.com

25. DOCE. Nuevas recomendaciones sobre la presencia de Deoxinivalenol, Zearalenona, Ocratoxina A y Fumonisinas en alimentos para animales. http://www.engormix.com

26. Alberto Gimeno. Las fumonisinas y sus efectos indeseables en la producción porcina. http://www.engormix.com

27. Departamento técnico Investigación Aplicada S.A. de CV- IASA. Niveles de contaminación detactada en muestras de sorgo, maiz, silos oleaginosas y alimentos. http://www.engormix.com

28. DOCE. UE: Recomendación sobre la presencia de mcotoxinas en piensos. www.3tres3.com

29. VICAM. Método para la detección simultánea de múltiples micotoxinas. http://www.engormix.com

30. Xavier Casas, Veterinario (Divasa-Farmavic Austral, S.A.). Los lechones pequeños: un problema en maternidades. http://www.engormix.com

31. B.Malone, K.bond, C.Maune Trilogy Analytical Laboratory, Washington, MOy d.Zaviezo Special Nutrients, Miami, FL USA. Evaluación de la eficacia de un filosilicato purificado comercial para reducir la toxicidad de la zearalenona en cerditas. http://www.engormix.com

32. Martínez R., Greco C., Koncurat, M, Escribano C y Vivas A. Dpto anantomia y patología animal FAV, Dpto Inmunologia FCEFQyN UNRC, Rio Cuarto (Argentina). Perfiles séricos y placentarios de interferon-gamma y hormonas esteroideas durante la gestación en porcinos. http:// www.sian.info.ve

33. Alberto Gimeno. Consultor Técnico de SPECIAL NUTRIENTS (USA). Sensibilidad a algunas micotoxinas en varias especies animales. Revista Formulación Mayo-Junio 2007

34. G.Devegowda,DVM, Ph.D head, Division of animal Sciences, Collage of Veterinary Medicine. University of agricultural Sciences, Bangalore (India). El efecto de las micotoxinas en la producción porcina. http://www.acontece.com

35. Muzaffer Denli y José Francisco Pérez, Dpto de Ciencia animal i dels aliments Facultad de Veterinaria UAB. Contaminación por micotoxinas en los piensos: Efectos, tratamiento y prevención. XXII Curso de especialización FEDNA Barcelona 16 y 17 de octubre de 2007.

36. R.Sala Echave, G.Reguera Diaz de Terán, B.pérz-Llano, P.García Casado (Gestión Veterinaria Porcina S.L.). Micotoxinas y su impacto en la producción porcina. Revista Albéitar 112:34-38.

37. Micotoxinas bajo control. Revista Formulación Septiembre- Octubre 2006.

38. Opinion of the scientific Panel on contaminants in the food Chain on a request from the commission related to zearalenone as underisable substance in animal feed. The EFSA Journal (2004) 89: 1-35.

39. Conferencia pronunciada el 19-6-1997 en Campillos por el Dr. Miguel Pontes. Micotoxinas y su patología. Circular 19. http://www.tecna.org

Pfizer Animal Health

VACCINO PFIZER
PER LA RIDUZIONE
DELL'ODORE DI VERRO.
PROFITTO EVIDENTE.

Vaccino Pfizer per la riduzione
dell'odore di verro.
Il futuro è adesso

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ERGOMETRINA NELLE FASI INIZIALI DEL PARTO IN SCROFE CON DIFFERENTE CONDIZIONE CORPOREA

EFFECTS OF ERGOMETRINE'S ADMINISTRATION IN THE EARLY stages of the farrowing IN SOWS WITH DIFFERENT BODY CONDITIONS

SCOLLO A.[1], TONON F.[2], ROSSETTO G.[2], STELLETTA C.[3], MAZZONI C.[2], BORRI E.[2], RAFFI V.[2]

[1]Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Animali;
[2]Medico Veterinario Libero Professionista, Suivet;
[3]Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie.

Parole chiave: ergometrina, parto, scrofa, condizione corporea.
Key words: ergometrine, farrowing, sow, body condition.

Riassunto: Sono stati osservati 434 parti, divisi in due gruppi di trattamento: nel gruppo A (n=105) è stata somministrata Ergometrina Maleato durante le prime fasi espulsive del parto; nel gruppo B (n=329) lo stesso trattamento è stato fatto alla fine del travaglio. I risultati sono stati comparati anche per lo stato corporeo della scrofa. Si è registrato una diminuzione della durata del parto nelle scrofe magre trattate precocemente, mentre le scrofe grasse hanno manifestato un aumento della durata del travaglio e peggiori performance riproduttive successive. In entrambi i casi si rende necessaria una costante assistenza della scrofa durante le fasi espulsive.

Abstract*: The study was carried out considering 434 farrowing data. There were two different groups of treatment: in A group, sows (n=105) were treated with Ergometrine Maleate during the early stages of the farrowing. In B group, sows (n=329 were treated with the same molecule at the farrowing end. Results were compared taking into consideration classes of body condition. A significative decrease of the farrowing duration was showed by thin A group sows while fat sows showed an increase of the farrowing duration and worse following reproductive performances. In both cases is necessary a constant assistance of the sow during expulsive phases.*

INTRODUZIONE

Le emorragie post partum sono una delle più comuni cause di morte materna, nelle specie domestiche come nella donna (G. A. Dildy, 2002).

La causa più comune è l'atonia uterina, ovvero un'insufficiente contrattilità dell'utero dopo il distacco della placenta. In condizioni normali l'emostasi fisiologica delle arterie e delle vene uterine danneggiate dopo il secondamento avviene per la contrazione del miometrio, che comprime i vasi e ne oblitera il lume. In caso di atonia ciò non avviene, e la situazione può essere aggravata dalla ritenzione di frammenti placentari che restano aderenti al miometrio impedendo la sua retrazione (F. W. Bouwmeester, 2005).

La prevenzione si attua con la gestione attiva del parto mediante l'utilizzo di farmaci uterotonici, somministrati più o meno di routine alle scrofe partorienti perché consentono di ridurre le emorragie materne ed i parti languidi.
Tra gli uterotonici più utilizzati si annoverano gli alcaloidi dell'ergot, rappresentati per lo più dall'ergometrina. La sua azione si esplica grazie all'agonismo con i recettori alfa1 adrenergici della muscolatura liscia dell'utero, la quale durante il terzo trimestre di gravidanza acquisisce gradualmente una spiccata sensibilità a questa molecola (Meyers et al., 1975).

MATERIALI E METODI

In un allevamento intensivo convenzionale (ibrido commerciale UPB Genetic Word) sono stati osservati 444 parti di scrofe trattate con ergometrina.
I soggetti sono stati divisi in due gruppi di osservazione: nel gruppo di trattamento A (105 scrofe) sono stati somministrati intramuscolo 5ml di farmaco durante le prime fasi espulsive del parto; nel gruppo di trattamento B (330 scrofe) la somministrazione è avvenuta con le stesse modalità, ma al termine del parto.
In precedenza, tutte le scrofe pluripare sono state trattate alle ore 7 del 114° giorno di gestazione con prostaglandina (3mg di Alfaprostol intramuscolo) allo scopo di indurre il parto. Per entrambi i gruppi è stata utilizzata una scheda tecnica cartacea individuale per l'annotazione dei seguenti dati:

- numero di parti sostenuti dalla scrofa;
- durata totale del parto;
- numero di esplorazioni (effettuate ogni qualvolta si sia osservata una difficoltà di espulsione da parte della scrofa);
- numero di estrazioni;
- numero di nati morti (suinetti morti durante il parto);
- numero di feti (suinetti la cui morte si stima risalire a qualche giorno prima del parto, a giudicare dalle condizioni anatomo-patologiche);
- numero di nati vivi;
- spessore del grasso dorsale della scrofa al momento del parto (con strumento portatile a misurazione ultrasonica *Renco Lean-Meater (Renco corp.)* posizionato a 6 cm dalla linea mediana dorsale in corrispondenza dell'ultima costa (P2) (D.B. Jones, 1999).

Le scrofe sono state monitorate anche nel ciclo riproduttivo successivo.

Per poter valutare l'effetto dell'Ergometrina anche in relazione alla condizione corporea della scrofa, i soggetti sono stati classificati in base al loro spessore del grasso dorsale rilevato al parto: gruppo 1: scrofe magre con spessore uguale o minore a 11 mm (n=96); gruppo 2: scrofe intermedie con spessore compreso tra 12 mm e 15 mm (n=204); gruppo 3: scrofe grasse con spessore uguale o maggiore di 16 mm (n=134).

RISULTATI

La durata del parto risulta essere uno dei parametri maggiormente influenzati dal momento di somministrazione dell'Ergometrina. Le scrofe magre trattate nelle fasi espulsive iniziali hanno avuto una durata inferiore di circa 1 ora rispetto alle scrofe magre trattate alla fine del parto, mentre il trattamento precoce dei soggetti grassi ne ha aumentato significativamente la durata.

Anche il numero delle esplorazioni è stato influenzato dal trattamento: le scrofe del gruppo di trattamento A (Ergometrina nelle fasi iniziali del parto), hanno richiesto più assistenza, indipendentemente dalla condizione corporea, rispetto al gruppo B.

Significativa è risultata anche la relazione tra il numero di parti dalla scrofa (età) ed il suo gruppo di spessore del lardo al parto, indipendentemente dal gruppo di trattamento con il principio attivo: le scrofe più magre sono quelle più anziane.

Per quanto riguarda le ulteriori variabili prese in considerazione durante l'osservazione del parto, ovvero: numero di estrazioni, numero di nati morti, numero di nati vivi e numero di feti, non si sono rilevate differenze significative.

Tabella 1. Valori (media ± errore standard) dei parametri considerati durante le osservazioni dei parti, suddivisi per gruppo di spessore del lardo dorsale al parto.
Lettere diverse (a,b) all'interno di ogni parametro e trattamento identificano una differenza significativa tra le classi di spessore (P<0,05); Numero di asterischi diversi (*,**) tra i trattamenti all'interno di ogni classe di spessore identificano una differenza significativa (P<0,05).

		Gruppo1 Spessore lardo al parto: ≤11 mm	Gruppo2 Spessore lardo al parto: ≥12 mm e ≤15 mm	Gruppo3 Spessore lardo al parto: ≥16 mm
Durata parto (ore)	A	03.01±00.27[a]*	04.12±00.24	04.42±00.21[b]*
	B	04.01±00.01**	03.37±00.11	03.25±00.12˜**
Esplorazioni (n°)	A	2,778±0,275*	2,640±0,165*	2,611±0,195*
	B	2,103±0,132**	1,987±0,094**	2,112±0,118**
Estrazioni (n°)	A	1,857±0,406	1,381±0,235	2,000±0,298
	B	1,571±0,235	1,629±0,182	1,500±0,229
Feti (n°)	A	1,400±0,656	1,125±0,367	1,000±0,656
	B	1,957±0,306	1,929±0,277	1,750±0,299
Parti precedenti (n°)	A	2,444±0,312[a]	1,540±0,187[b]	1,417±0,221[b]
	B	2,282±0,150[a]	1,558±0,107[b]	1,214±0,134[b]
Nati morti (n°)	A	1,097±1,032	1,177±0,896	1,054±0,954
	B	1,258±0,432	1,866±0,456	1,365±0,501
Nati vivi (n°)	A	11,056±0,769	11,200±0,461	11,111±0.544
	B	11,308±0,369	11,169±0,263	10,939±0,329

L'analisi dei dati produttivi relativi alla figliata successiva (intervallo svezzamento – 1° calore utile, numero di nati vivi, dei nati morti e dei feti) ha evidenziato differenze significative solo per il numero dei feti: le scrofe grasse trattate con Ergometrina nelle fasi iniziali del travaglio hanno avuto un aumento significativo del numero di feti. I soggetti magri non ne sono invece influenzati in alcun modo.

Tabella 2. Valori (media ± errore standard) dei parametri riproduttivi del ciclo successivo, suddivisi per gruppi di spessore del lardo al parto.
Lettere diverse (a,b) all'interno di ogni parametro e trattamento identificano una differenza significativa tra le classi di spessore (P<0,05); Numero di asterischi diversi (*,**) tra i trattamenti all'interno di ogni classe di spessore identificano una differenza significativa (P<0,05).

		Gruppo1 Spessore lardo al parto: ≤11 mm	Gruppo2 Spessore lardo al parto: ≥12 mm e ≤15 mm	Gruppo3 Spessore lardo al parto: ≥16 mm
Intervallo svezzamento – 1° calore utile (gg)	A	9,657±4,191	10,381±2,419	12,781±2,772
	B	10,048±1,975	9,403±1,381	9,941±1,701
Nati vivi (n°)	A	11,083±0,910	11,083±0,607	10,444±0,607
	B	10,473±0,425	10,973±0,301	10,513±0,357
Nati morti (n°)	A	1,000±1,050	1,286±0,794	1,000±0,857
	B	1,278±0,495	2,037±0,404	1,526±0,482
Feti (n°)	A	1,750±0,671	1,385±0,526[a]	3,231±0,526[b]*
	B	2,773±0,405	1,660±0,268	1,536±0,359**

DISCUSSIONE

La somministrazione precoce o tardiva di Ergometrina in scrofe con diverso spessore del lardo dorsale dà luogo ad effetti differenti.
Rispetto ai dati riportati in bibliografia (3.30 ore di media circa, R.P. Cowart, 2005), il trattamento nelle fasi iniziali del parto provoca:

- nei soggetti grassi un aumento della durata totale del parto;
- nei soggetti magri una riduzione dello stesso.

Osservando la variabile del numero di parti precedenti, si può affermare che le scrofe con la migliore condizione corporea siano quelle più giovani e con una carriera riproduttiva ancora all'inizio. La progressiva perdita di tale stato di ingrassamento con l'avanzare del numero di parto è una condizione fisiologica che inevitabilmente finisce per influenzare anche la sfera riproduttiva (B. Holm, 2005).

Tabella 3. Valori medi del numero di parti già sostenuti dalla scrofa, suddivisi per il gruppo di spessore al lardo.

	Gruppo1 Spessore lardo al parto: ≤11 mm	Gruppo2 Spessore lardo al parto: ≥12 mm e ≤15 mm	Gruppo3 Spessore lardo al parto: ≥16 mm
Media del numero di parti precedenti della scrofa	2,3125	1,5539	1,2685

Le maggiori difficoltà di parto riscontrate a carico delle scrofe giovani trattate precocemente piuttosto che di quelle anziane, riporta allo studio di Olmos-Hernandez et al. (2006), che dimostra come la frequenza e l'intensità delle contrazioni nelle scrofe giovani sono decisamente maggiori rispetto alle pluripare, che presentano invece contrazioni di più lunga durata. Questo fa supporre che l'uso all'inizio del travaglio di Ergometrina nelle scrofe anziane migliori l'efficienza e la velocità del parto in quanto interviene su un tessuto di per sé meno contratto, mentre in quelle giovani causa eccessiva forza di contrazione, con conseguente aumento della durata del parto.

Tuttavia, qualunque sia la condizione corporea della scrofa, la somministrazione di Ergometrina nella fase iniziale del parto è accompagnata dall'aumento del numero di esplorazioni necessarie. Ciò è evidente soprattutto nei soggetti con condizione corporea scarsa, che probabilmente presentano maggiore spazio nel canale del parto non supportato dalla presenza di grasso, che consente un incremento dei mal posizionamenti. (R.D. Boyd, 2002)

Nei risultati ottenuti dall'osservazione del parto successivo, le scrofe grasse trattate nelle fasi iniziali del parto con Ergometrina presentano un aumento del numero di feti. Dunque la somministrazione del farmaco negli animali giovani non solo ne aumenta la durata totale del parto ma ne condiziona negativamente anche le performance riproduttive successive, probabilmente perché sottopone ad uno stress eccessivo il tessuto uterino che non riesce a svolgere appieno la sua funzione nella gravidanza successiva.
Anche in questo caso però l'utilizzo dell'Ergometrina all'inizio del parto risulta svantaggioso solo nelle scrofe con maggiore spessore del lardo dorsale: nei soggetti magri infatti ne migliora le performance riproduttive diminuendo il numero di feti del parto successivo.

Una riflessione nasce in merito all'eventuale sofferenza fetale causata dall'aumento delle contrazioni, inevitabilmente associate alla riduzione del flusso ematico al nascituro per l'occlusione di alcuni vasi, indipendentemente dall'ordine di parto.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti, si rende indispensabile valutare la condizione corporea della scrofa prima di decidere in quale momento del parto somministrare l'Ergometrina. Nel caso ci si trovi di fronte un soggetto grasso è controindicato l'uso del farmaco nella fase iniziale del travaglio, in quanto porta ad un aumento della sua durata totale, alla maggiore necessità di

assistenza e a peggiori performance riproduttive successive (più feti nel parto successivo). L'uso all'inizio del parto è però vantaggioso nel caso delle scrofe magre, che dimostrano una diminuzione della durata del parto senza risentimenti nel ciclo seguente. Anch'esse avranno bisogno però di maggiore assistenza al parto, dunque il trattamento precoce si consiglia solo nel caso in cui la gestione dell'allevamento preveda una costante assistenza della scrofa durante le fasi espulsive.

BIBLIOGRAFIA

- Barb C.R., Hausman G.J., Lents C.A. (2008) "Energy metabolism and Leptin: effects on neuroendocrine regulation of reproduction in the gilt and sow". Reprod Domest Anim. Vol. 43- supplement 2.
- Holm B., Bakken M., Klemetsdal G., Vangen O. (2004) "Genetic correlations between reproduction and production traits in swine". J Anim Sci. 82, 3458-3464.
- Olmos-Hernandez A. et al. (2006) "Can uterotonics reduce fetal and newborn piglet mortality by perinatal asphyxia and improve functional vitality?". J Med Sci 6(6), 884-893.
- Dildy G.A. (2002) "Postpartum Hemorrhage: New Management Options". Clin Exp Obstet Gynecol. Vol. 45-number 2, 330-344.
- Bouwmeester F.W., Bolte A.C., Van Geijn H.P (2005) "Pharmacological and surgical therapy for primary postpartum hemorrhage". Curr Pharm Des. 11, 759-773.
- Meyers, Jawetz, Goldfien (1975). "Farmacologia medica", Piccin editore.
- Saito K., Haruki A., Ishikawa H., Takahashi T., Nagase H., Koyama M., Endo M., Hirahara F. (2007) "Prospective study of intramuscular ergometrine compared with intramuscular oxytocin for prevention of postpartum hemorrhage". J Obstet Gynecol Res. Vol. 33(3), 254-258.
- De Costa C. (2002) "St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine". The Lancet. Vol 359.
- Jones D.B., Stahly T. S. (1999) "Impact of amino acid nutrition during lactation on body nutrient mobilization and milk nutrient output in primiparous sows". J Anim Sci. 77, 1513-1522**.**
- Cowart R.P. (2005) "Parturition and Dystocia in Swine" in "Large Animal Theriogenology", ed. Saunders, 2005, cap. 103.
- Boyd R.D. (2002) "Nutrition and Management of the Sow to Maximize Lifetime Productivity". Abstracts Banff Conference.

ULCERA GASTRICA DEL SUINO E MACINAZIONE DEI MANGIMI: UN CASO CLINICO.

SWINE GASTRIC ULCER AND FEED PARTICLE SIZE: A CASE STUDY.

SPADA, F.[1], BARICCO,G.[2]

[1]Facoltà Medicina Veterinaria Torino, Dipartimento Patologia Animale; [2]Medico Veterinario Libero Professionista, Torino

Parole chiave: ulcera gastrica, necroscopia, analisi granulometriche, analisi di laboratorio
Key words: gastric ulcer, necropsy, granulometric analysis, analysis of laboratory

Riassunto:
Durante le routinarie visite di monitoraggio in un allevamento del Club Moretta, uno dei dieci resisi disponibili ad ospitare alcuni studenti nell'ambito del programma di insegnamento della Scuola di Specializzazione in Patologia Suina dell'Università degli Studi di Torino, l'allevatore riferiva di alcuni casi di diarrea ematica e melena in suini in fase di magronaggio e ingrasso. I soggetti venivano sottoposti ad esame clinico e a prelievo di materiale fecale da inviare al laboratorio . Ricontattati alcuni giorni dopo procedevamo all'esame necroscopico dei soggetti morti, al prelievo di materiale da fissare in formalina per l'esame istologico e di materiale biologico per gli esami colturali e al ricampionamento del mangime impiegato dall'allevatore durante le fasi di magronaggio e ingrasso per l'analisi granulometrica. La necroscopia, insieme con l'esame clinico dei soggetti, confermava la diagnosi di sospetta ulcera gastrica. L'esame granulometrico dei mangimi ha sottolineato la necessità di aumentare le dimensioni della griglia di macinazione delle materie prime del mangimificio aziendale, al fine di evitarne l'eccessiva polverosità e finezza.

Abstract:
During the routinely visits in one breeding unit of the Club Moretta, one of the ten farms that gave availability to entertain some students within the teaching program of the School of Specialization in Swine Pathology of the University of Turin, the owner reported some cases of diarrhea with blood and melena in pig in phase of weaning and fattening. The subjects were submitted to clinical examination and we collected faeces sent it to the laboratory. After some days we proceeded to the necropsy of the dead subjects, to collect material to fix it in formalin for the histological examination and to collect biological material for the cultural examinations and we sampled again the food employed by the breeder during the phases of post - weaning and fattening for the granulometric analysis. The necropsy, together with the clinical examination of the subjects, confirmed the diagnosis of gastric ulcer. The granulometric analysis of the foods has underlined the necessity to increase the size of the grate of the mills with the purpose to avoid its excessive dustness and fineness.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento intensivo del suino il riscontro di patologie di carattere gastro-enterico solitamente allarma l'allevatore, in particolare quando in seguito ad alcuni casi si riscontra un aumento della mortalità in animali in fase di magronaggio e ingrasso. È proprio durante una delle visite in uno dei dieci allevamenti del Club Moretta (gruppo di Aziende che collaborano con la Scuola di Specializzazione in Patologia Suina dell'Università di Torino) che i proprietari hanno segnalato la presenza di alcuni soggetti con sintomatologia gastro – enterica. Alla visita clinica i suini apparivano debilitati, con segni di depressione del sensorio e mucose bianco-porcellanate. Le loro feci si presentavano molli, collose e nerastre, segno indicativo della presenza di sangue

parzialmente o totalmente digerito e perciò proveniente dalla porzione più craniale dell'apparato gastro-enterico. La diagnosi si orientava sul sospetto di ulcera gastrica, una forma di tecnopatìa che interessa trasversalmente aspetti zootecnici, medici, genetici e di management. Dopo aver escluso la possibile precedente somministrazione ai suini di farmaci anti-infiammatori non steroidei, i quali possono interferire e danneggiare una mucosa gastrica mai completamente integra, si è proceduto a prendere in esame le altre possibili cause di ulcera gastrica nei suini.

MATERIALI E METODI

Durante la visita clinica sono stati effettuati dei prelievi di feci sui soggetti sintomatici. Le feci sono poi state inviate al laboratorio dell'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta presso la sede di Torino per la ricerca di *Brachyspira spp*.

Nei giorni successivi sono stati eseguiti tre esami necroscopici su soggetti deceduti in allevamento, prelevati organi per l'esame istologico e materiale biologico per l'esame batteriologico.

Al momento della seconda visita in allevamento venivano eseguiti anche due prelievi di mangime, un campione di quello per suini da ingrasso e uno per suini in fase di magronaggio da inviare all'analisi granulometrica. Infatti la presenza nel mangime di un eccesso di farine fini potrebbe essere causa di un maggior grado di rimescolamento della massa contenuta nello stomaco, e di conseguenza di una esposizione più prolungata della mucosa della *pars oesophagea* a materiale caratterizzato da un pH particolarmente basso. Inoltre con l'ingestione di farine fini si assisterebbe ad una maggiore velocità di svuotamento dello stomaco, che favorirebbe la risalita dei succhi biliari fino alla mucosa della *pars oesophagea,* sulla quale agirebbe in modo da favorire l'instaurarsi di fenomeni erosivi.

Successivamente su alcuni soggetti sintomatici sono stati eseguiti dei prelievi ematici da sottoporre ad esame virologico e ad esame emocromocitometrico per la determinazione di eventuali patologie concomitanti e lo studio dell'anemia correlata alla presenza dell'ulcera gastrica.

Sono poi state predisposte delle visite in azienda al fine di eseguire degli esami endoscopici sui soggetti sintomatici e programmare dei prelievi in vivo su tali animali.

RISULTATI

L'esame culturale delle feci ha evidenziato la presenza di *Brachispira* in uno dei soggetti, che è stata ritenuta incidente e non determinante.

Alla necroscopia tutti e tre i soggetti esaminati presentavano, a livello dello stomaco, segni macroscopicamente evidenti (Foto 1 e 2) di lesioni erosive e coaguli ematici.

Foto 1: Presenza di coaguli ematici e sangue nello stomaco

Picture 1: Presence of clots and blood in the stomach

Foto 2: Erosione della mucosa gastrica

Picture 2: Erosion of the gastric mucosa

Istologicamente si evidenziavano quadri di ipercheratosi della mucosa gastrica, preludio alla vera e propria ulcera riscontrata in uno dei suini sottoposti a necroscopia.

L'analisi granulometrica dei mangimi, confrontata con i risultati della stessa analisi svolta alcuni mesi prima dell'insorgere della sintomatologia, ha evidenziato un diverso e crescente grado di finezza della miscelazione, in un ambito generale di macinazione eccessiva (Tab1a e 1b).

MAGRONAGGIO	**Analisi granulometrica del 28/08**	**Analisi granulometrica del 10/12**
<150 um	8,80%	13,40%
150-500 um	35,50%	34,70%
500-100 um	37,60%	33,10%
> 1000 um	18,10%	18,80%

Tab1a. Granulometria mangime suini megronaggio
Tab1a. Grit feed for post weaning pigs

INGRASSO	**Analisi granulometrica del 03/09**	**Analisi granulometrica del 10/12**
<150 um	6,60%	14,30%
150-500 um	42,10%	37,40%
500-100 um	35,50%	30,60%
> 1000 um	15,80%	17,70%

Tab1b. Granulometria mangime suini ingrasso
Tab1b. Grit feed for fattening pigs

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'anamnesi clinica e gli esami necroscopici hanno confermato la diagnosi di ulcera gastrica. Le cause di tale patologia sono state prese in considerazione e le analisi finora eseguite hanno evidenziato una probabile correlazione tra il grado di macinazione dei mangimi e l'instaurarsi della patologia.
L'allevatore ha proceduto autonomamente per un breve periodo a somministrare ai suini interessati un mangime addizionato di idrossido di alluminio, ottenendo risultati scarsi.
Risultati apprezzabili sono stati invece ottenuti modificando le dimensioni della griglia di macinazione dei mangimi (Tab 2), osservandosi nell'arco di quattro-sei settimane dalla modifica della procedure di macinazione aziendale una completa remissione della sintomatologia.

	Analisi granulometrica Magronaggio	**Analisi granulometrica Ingrasso**
<150 um	1,80%	2,20%
150-500 um	25,50%	22,40%
500-100 um	27,60%	31,40%
> 1000 um	45,10%	44,00%

Tab 2. Granulometria mangime suini magronaggio e ingrasso in seguito all'aumento delle dimensioni della griglia di macinazione.
Tab 2. Grit feed for post weaning and fattening pigs after the increased size of the grate of the mills

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Azienda Agricola Ellena di Villafalletto (CN) per la collaborazione prestata

BIBLIOGRAFIA

Botta Elena, Careddu M.Elena, Massa Manuela, Baricco Giuseppe (2009) "Indagine sulla granulometria dei mangimi in alcuni allevamenti di suini in provincia di Cuneo" XXXV Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini – Modena, 266-275
Kopinski JS, McKenzie RA. (2007) "Oesophagogastric ulceration in pigs: a visual morphological scoring guide." Aust Vet J. 356-61.
Doster AR. (2000) "Porcine gastric ulcer" Vet Clin North Am Food Anim Pract 163-74
Appino S, Guarda F, Pregel P, Amedeo S, Cutufia MA, Bellonio G, Ponzetto A (2006) "Detection of helicobacter candidatus suis by PCR in oesophagogastric ulcers of swine in Italy." Acta Vet Hung. 517-24.

ANALISI DI INDICATORI DI EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE VERSO PCV2 NEI SUINETTI.

ANALYSIS OF EFFICACY PARAMETERS IN PCV2 VACCINATED PIGS

TERRENI M.[1], VISCHI O.[1], MARTELLI P.[2]

[1]*Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica*
[2]*Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma*

Parole chiave: PCV2, vaccinazione, beneficio
Key words: PCV2, vaccination, benefit

Riassunto: la malattia da PCV2 è oggigiorno considerata una delle principali malattie del suino in tutto il mondo. Nell'ambito della PCVD si riconoscono forme acute, riconducibili alla PMWS, e forme moderate o lievi. Questo studio ha inteso individuare i fattori che sono stati modificati dopo vaccinazione con Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) dei suinetti, in allevamenti che presentavo forme cliniche differenti di PCVD. Sono stati esaminati i risultati raccolti in tre differenti esperienze sperimentali nazionali che si distinguevano per la presenza di forme diverse di PCVD .
Criterio discriminante per l'inclusione nello studio è stata la possibilità di poter raccogliere i dati dei gruppi sperimentali fino alla macellazione, avvenuta oltre i 270 gg di età. I gruppi vaccinati con Ingelvac CircoFLEX hanno presentato un significativo miglioramento dei dati esaminati, indifferentemente dalla forma di malattia presente o dalla tipologia di allevamento. La valutazione della riduzione della mortalità e degli scarti nei vaccinati vs controlli si è dimostrata, nei casi di allevamenti affetti da PCVD acuta o moderata, come parametro sensibile per una valutazione del beneficio conseguente all'introduzione della vaccinazione.

Summary: PCV2 associated disease (PCVD) is nowadays considered as one of the most important disease worldwide. Within PCVD different forms are described: acute (PMWS) ,moderate and mild ones. This study aimed to identify the parameters that have been modified after piglet vaccination with Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) in farms presenting different forms of PCVD. Pre-requisite for the inclusion in the study has been the likelihood to collect the data of the experimental groups for the entire production cycle, with slaughter at more than 270 days of age. The groups vaccinated with Ingelvac CircoFLEX® expressed a significant improvement of the parameters evaluated, whatever was the PCVD form present in the farm. The evaluation of the reduction of mortality and runts has been demonstrated, in the cases of acute and moderate PCVD of the study, as sensitive parameter to be evaluated for the economic calculation of the benefit after vaccination.

Introduzione

La prima segnalazione della malattia da circovirus tipo 2 (PCV2) risale al 1996, quando la presenza del virus è stata riconosciuta come indispensabile per l'espressione della PMWS (Post Weaning Multisysteic Wasting Syndorme) (1,2,3). L'insieme delle patologie in cui

PCV2 è coinvolto è oggi riunito nell'acronimo PCVD (Porcine CircoVirus Disease o Malattia da Circovirus), una delle principali malattie del suino in tutto il modo (4).
Nell'ambito della PCVD si riconoscono forme acute, riconducibili alla PMWS, e forme moderate o lievi, in cui l'assenza dell'espressione più drammatica della sintomatologia lascia spazio ad un aumento della mortalità e della percentuale di animali sottopeso o scarsamente performanti (scarti).
Da pochi anni sono disponibili su mercato differenti presidi immunizzanti contro PCV2: vaccino spento a virus intero, vaccino spento a sub-unità contenente ORF2 di PCV2, vaccino chimerico spento in grado di esprimere PCV2 e PCV1 (6,7,8,9).
I vaccini che hanno rivelato la maggiore efficacia in termini di protezione sono stati quelli in grado di esprimere una specifica risposta alla proteina capsidica. Questa proteina è stata riconosciuta come quella di maggiore importanza in termini di immunogenicità e di protezione (5). Per la valutazione del beneficio della vaccinazione risulta particolarmente importante identificare quali sono i parametri da sottoporre all' analisi del ritorno sull'investimento, escludendo tutti quei fattori che, pur interferendo con il reddito d'impresa, non possono essere modificati dalla vaccinazione nei confronti di PCVD.
Questo studio ha inteso individuare i fattori che sono stati modificati dopo vaccinazione con Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim Italia S.p.A. divisione Vetmedica) dei suinetti in allevamenti colpiti da forme cliniche differenti di PCVD. Tale obbiettivo è finalizzato a segnalare i parametri principali da ponderare all'atto della valutazione del benefico dalla vaccinazione.

Materiali e Metodi

Allevamenti
Sono stati esaminati i risultati raccolti in tre differenti esperienze sperimentali nazionali che si distinguevano per la presenza di forme diverse di PCVD .
Criterio discriminativo per l'inclusione nello studio è stata la possibilità di poter raccogliere i dati dei gruppi sperimentali fino alla macellazione, avvenuta oltre i 270 gg di età.
Nei primi due casi (C1 e C2), sono stati inclusi due allevamenti con forma acuta di PCVD, caratterizzata dalla presenza di una 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. Nel terzo caso (C3) è stato incluso un allevamento, 200 scrofe, multisede, che presentava una forma moderata di PCVD, con perdite totali di circa il 12%
Le caratteristiche principali degli allevamenti considerati all'interno dello studio sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1: caratteristiche principali allevamenti
Table 1: main characteristic of the farm inclueded

Caso	PCVD	Dimensione allevamento	tipologia
1	acuta	400 scrofe	multisede
2	acuta	700 scrofe	sito unico
3	moderata	2000 scrofe	multisede

La presenza di PCV2 nei casi 1 e 2 era stata dimostrata attraverso identificazione del genoma del virus nel sangue e nei tessuti dei suini clinici in fase post-svezzamento (siti due). L'analisi è stata corredata anche da una valutazione quantitativa della presenza di PCV2 nei campioni, tramite Q-PCR. In C3, la presenza di PCV2 era stata precedentemente evidenziata attraverso identificazione di PCV2 nei tessuti.

Suini inclusi nello studio
Caso 1 e 2:
I suini inclusi nella prova sono stati allocati casualmente al gruppo vaccinato (CircoFLEX) o di controllo. 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, alimentazione e condizioni microclimatiche.
Sono stati allocati allo studio 381 suini nel gruppo CircoFLEX e 397 nei controlli nel sito sperimentale **C1**, 261 (CircoFLEX) e 261 (controlli) in **C2**.
Inoltre, sono stati pianificati prelievi di sangue su 10 suini per gruppo sperimentale, il giorno della vaccinazione (T0), 4 settimane dopo (T1), nel momento della comparsa della PCVD (T2) e prima della macellazione (T3).
Sono stati raccolti per ogni gruppo, e per ogni sezione di alloggiamento, numero di suini entrati ed usciti, età, morti, scarti, peso all'ingresso e all'uscita. Inoltre, sono state valutati i pesi delle carcasse la macello, oltre che l'età dei suini al macello.
Caso 3
Nella azienda **C3** è stato condotto uno studio SPC (Statistical Process Control), dove sono stati messi a confronto i dati di 6 lotti di suini di controllo precedenti alla vaccinazione con 6 lotti vaccinati. In totale sono stati inclusi 7199 suini di controllo vs 7367 vaccinati. Sono stati raccolti, per ogni gruppo e per ogni sezione di alloggiamento, numero di suini entrarti ed usciti , morti, scarti e la settimana di macellazione

Vaccino
Per l'immunizzazione attiva dei suinetti è stato utilizzato un vaccino inattivato a sub-unità (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 nei gruppi CircoFLEX sono stati vaccinati con 1 ml di Ingelvac CircoFLEX®, in dose unica, somministrato per via intramuscolare, vicino allo svezzamento.

Statistica
La mortalità e la percentuale di scarti sono stati confrontati utilizzando il test Chi-quadrato (C1,C2,C3) (Statitistica® v8.0, Statsoft®, USA) mentre le differenze dei pesi e dell'età al macello sono stati analizzati mediante two-sample t-test (C1 e C2) (SAS System, SAS Inst., Cary, North Carolina, v 8.2).

Calcolo economico
I risultati raccolti dalla vaccinazione nell'allevamento con forma moderata (C3) sono stati sottoposti ad una valutazione di ordine economico. La metodologia ha preso in esame la mancata opportunità di vendita per i suini morti e scarti: tale valore ha considerato il valore di un suino medio, da cui è stato sottratto il costo dell'alimento non consumato. Le assunzioni considerate ai fini del calcolo sono state: prezzo medio alimento EURO 200/ton, IC di 3,9, prezzo di mercato per il suino grasso di 1,25 €/Kg e valore dello scarto 0,3€7Kg.

Risultati

I suini vaccinati non hanno presentato alcuna reazione avversa, né locale né sistemico.
L'inclusione è avvenuta in **C1** a 28 gg di vita, nell'allevamento **C2** a 27 gg mentre in **C3** a due mesi di età.
Per quanto riguarda le due esperienze raccolte nelle aziende con la fase acuta, la malattia associata all'infezione da PCV2 in **C2** è comparsa già 4 settimane dopo lo svezzamento, mentre in **C1** circa 45 gg dallo svezzamento. I prelievi di sangue sono stati effettuati a età differenti, in relazione alla sospetta comparsa della PCVD (vedi tabella 2)

Tabella 2: Protocollo dei prelievi di sangue
Table 2: blood sampling time

	età (gg di vita)	
prelievo	**C1**	**C2**
T0	*28*	*27*
T1	*56*	*55*
T2	*70*	-
T3	*270*	*270*

Allo svezzamento nessun campione di sangue è risultato PCR positivo per PCV2. Nell'allevamento **C2** la comparsa della PCVD è stata registrata precocemente, con viremia 4 settimane dopo lo svezzamento. Pertanto non si è proceduto con il prelievo T2. Una seconda fase viremica è stata registrata in associazione alla comparsa dei sintomi riferibili a PCVD nell'ultimo mese prima della macellazione solo nei suini di controllo. Per contro, nessun campione da soggetti vaccinati è risultato positivo alla PCR per PCV2.
La concomitanza tra evidenza clinica e viremia da PCV2 è stata rilevata al tempo T2 nella azienda **C1.** In questo sito sperimentale i suini di controllo sono risultati viremici già nel prelievo precedente (T1), nonostante non presentassero ancora alcun segno clinico. Si segnala che la PCVD si è espressa in tutta la sua magnitudine circa 7 giorni dopo il prelievo al T1. (tabella 3)

	CASO 1				CASO 2			
	Vaccinati		controlli		Vaccinati		controlli	
	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR	viremici	q-PCR
T0	0	negativa	0	negativa	0	negativa	0	negativa
T1	0	negativa	100	5,2 - 5,5	0	negativa	40	3,6 - 9,7
T2	30	3,5 - 4,5	100	3,5 - 7,8				
T3	0	negativa	0	negativa	0	negativa	70	3,7 - 6
	(%)	*(min-max)*	*(%)*	*(min-max)*	*(%)*	*(min-max)*	*(%)*	*(min-max)*

Tabella 3: q-PCR per PCV2
Table 3: q-PCR per PCV2

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 *Actinobacillus pleuropneumoniae* nella azienda **C1**, osservato dopo il trasferimento nel sito 3. In **C1** la

mortalità durante la permanenza nel sito 2 è stata superiore nei controlli vs vaccinati (8,8% vs 2,1%; p<0,0001) e tale differenza si è amplificata nel sito 3 (28,4% vs 7,4%; p<0,0001). Il dato cumulativo di mortalità nei controlli vs vaccinati, dallo svezzamento alla vendita, è risultato rispettivamente del 34,3% vs 9,2% (p<0,0001).
Nel secondo allevamento (C2) la mortalità è stata superiore nei controlli in tutte le sezioni, con significatività statistica in svezzamento (p<0,02) e ingrasso (p<0,001). Il dato cumulativo è stato di 4,2% nei vaccinati vs 12,6 nei controlli (p<0,001).
Anche la percentuale di scarti è stata decisamente inferiore nei gruppi vaccinati rispetto i controlli. Segnatamente, in **C1** è risultata del 5,2% vs 9,6% (p<0,03) mentre in **C2** è stata del 7,3% vs 13,8% nei controlli (p<0,02). (Tabella 4 e 5)
Analogamente ai miglioramenti a carico dei parametri sanitari, in tutti i gruppi vaccinati è stato apprezzato una migliore performance di crescita. Nel primo allevamento gli animali vaccinati hanno raggiunto il macello a 285 gg di età vs 300 dei controlli (p<0,001), con un peso medio delle carcasse di 130,3 Kg per il gruppo CircoFLEX vs 129,3 dei controlli.
In **C2** la macellazione è avvenuta a 303 gg di età per i vaccinati vs 304 dei controlli, con un peso medio delle carcasse di 140,6 per il gruppo CircoFLEX vs 135,5 dei controlli (p<0,01).

Tabella 4: *caso 1, mortalità e scarti*. *(p-value* ≥ 0.05 non statisticamente significativo – ns)
Table 4: Case 1, mortality and runts *(p-value* ≥ 0.05 not significant – ns)

Periodo	***Parametro***	**CircoFLEX**	***Controllo***	***p-value***
SITO 2	Mortalità, (%)	2.1	8.8	**< 0.0001**
	Scarti, (%)	0.5	0.8	**ns**
SITO 3	Mortalità, (%)	7.4	28.4	**< 0.0001.**
	Scarti, (%)	4.9	9.8	**< 0.02**
TOTALE	Mortalità, (%)	9.2	34.3	**< 0.0001.**
	Scarti, (%)	5.2	9.6	**< 0.03**

Tabella 5: *caso 2, mortalità e scarti*. *(p-value* ≥ 0.05 non statisticamente significativo – ns)
Table 5: Case 2, mortality and runts *(p-value* ≥ 0.05 not significant – ns)

Periodo	***Parametro***	**CircoFLEX**	***Controllo***	***p-value***
SVEZZAMENTO	Mortalità, (%)	0.8	3.8	**< 0.02**
	Scarti, (%)	1.9	9.6	**< 0.001**
MAGRONAGGIO	Mortalità, (%)	2.4	2.7	**n.s.**
	Scarti, (%)	2.4	2.2	**n.s.**
INGRASSO	Mortalità, (%)	1.2	7.9	**< 0.001**
	Scarti, (%)	3.3	2.8	**n.s.**
TOTALE	Mortalità, (%)	4.2	12.6	**< 0.001**
	Scarti, (%)	7.3	13.8	**< 0.02**

Nella prova condotta nella azienda con a forma moderata della malattia da circovirus sono stati confrontati i dati raccolti da 6 gruppi prima dell'introduzione della vaccinazione con i primi sei gruppi vaccinati. Un Totale di 6903 controlli e 6776 vaccinati sono stati macellati ad una età media di 42 settimane. La macellazione dei controlli è iniziata la seconda settimana di marzo e si è conclusa alla quarta di aprile. I vaccinati sono stati, invece, macellati a partire dalla prima settimana di maggio, fino alla seconda di giugno.
Le perdite totali, calcolate dall'ingresso nel sito 2 alla macellazione, sono state significativamente inferiori nel gruppo CircoFLEX (8%) rispetto ai controlli (12,4%) (P<0,0001).
La mortalità nei due gruppi è stata del 1,8% (controlli) vs 1,4 (CircoFLEX) durante la permanenza nel sito due e del 4,5% vs 2,2% nel sito tre (p<0,0001).
Per quanto concerne gli scarti, i valori percentuali sono stati pari a 1,2 (controlli) vs 2,4 (CircoFLEX) (p<0,0001) nel sito due e 4,5 (controlli) vs 3,3 (CircoFLEX) nel tre (p=0,0007).
(tabella 6)

Tabella 6: *caso 3, mortalità e scarti*. *(p-value* ≥ 0.05 non statisticamente significativo – ns)
Table 6: case 3, mortality and runts *(p-value* ≥ 0.05 not significant – ns)

Periodo	*Parametro*	**CircoFLEX**	*Controllo*	*p-value*
Sito 2	Mortalità %	1,4	1,8	ns
	Scarti, %	1,2	2,4	<0,0001
Sito 3	Mortalità %	2,2	4,2	<0,0001
	Scarti, %	3,3	4,4	0,0007
Totale	Mortalità %	3,6	5,8	<0,0001
	Scarti, %	4,5	6,6	<0,0001

La valutazione di ordine economico ha considerato l'impatto che mortalità e scarti hanno sulla vendita. Tale interferenza è stata considerata come "opportunità di vendita perduta". La significativa differenza nelle perdite totali tra i gruppi ha prodotto un vantaggio per i vaccinati pari a €5,45/capo.

Discussione
I gruppi vaccinati con Ingelvac CircoFLEX® hanno presentato un significativo miglioramento, indifferentemente dalla forma di malattia presente o dalla tipologia di allevamento.
L'analisi dei parametri che risentono favorevolmente della vaccinazione ha identificato nella riduzione della mortalità e della percentuale di scarti elemento comune tra le diverse prove. In C1, C2 e C3 i suini vaccinati hanno sempre assicurato una riduzione statisticamente significata delle perdite totali. In corso di forma acuta il miglioramento osservato è stato di tale entità da non richiedere una valorizzazione economica(10,11). Differente può essere lo scenario nelle forme meno gravi di PCVD, dove l'impatto inferiore della mortalità e scarti sul reddito d'impresa, suggerisce una valutazione precisa del beneficio conseguente alla implementazione di piani vaccinali prevalentemente mirati alla riduzione dei parametri sopra citati. L'analisi economica effettuata sui dati raccolti in C3 ha fornito un evidente indicazione di beneficio, pari a €5,45/capo, proveniente esclusivamente dalla riduzione delle perdite totali senza computare parametri di crescita e di età di macellazione.
La valutazione della viremia dopo vaccinazione non è stata, al contrario, riconosciuta come

parametro significativo al fine di confermare l'efficacia della vaccinazione. Il valore della viremia era già stato precedentemente indagato (12,13) in specifici studi dove era stata dimostrata la presenza di una relazione diretta tra viremia e crescita nella popolazione non vaccinata e l'assenza di tale relazione dopo vaccinazione.
Nelle due esperienze in cui è stato possibile valutare anche la crescita degli animali, segnatamente in C1 e C2, l'età alla macellazione e/o il peso delle carcasse hanno evidenziato significativi miglioramenti, corroborando i benefici già garantiti dalla riduzione delle perdite.
Il sistema di valutazione basato sul calcolo della mancata opportunità di vendita ha rappresentato un efficace strumento per descrivere più accuratamente il beneficio assicurato dalla vaccinazione.
La valutazione della riduzione della mortalità e degli scarti nei vaccinati vs controlli si è dimostrata, nei casi di allevamenti affetti da PCVD acuta o moderata, come esercizio efficace per impostare una valutazione sul beneficio conseguente agli effetti della vaccinazione.

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- 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.
4- Segales J. (2007): Global, local, and individual perspectives on PCVD. 20-25, Kernkamp Lecture at Leman Conference
5- 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.
6- Allan G, McNeilly F. PMWS/PCVD: diagnosis, disease and control: what do we know? Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. 2006.
7- 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.
8- 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.
9-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
10- 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) Atti XXXV SIPAS meeting 2009: 496-506
11- Terreni M., Caleffi A., Arioli E., Persico F., Martelli P. Suini contro il Circovirus: Efficacia della vaccinazione verso PCV2 in allevamenti colpiti da Malattia da Circovirus (PCVD). ODV,(2009) 6: 25-29.
12- Maass P., Liesner G.B., Orveillon F.X., Fachinger V. Impact of PCV2 viremia in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Proceedings of the 1st ESPHM, Copenhagen, Denmark, 2009: 61*
13- Holck H., Edler R., Diaz E. Correlation between viral load and performance in PCV2 vaccinated or non-vaccinated pigs. Allen D. Leman Swine Conference 2009: 167

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2010

PROGRAMMA DI ERADICAZIONE DI *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* IN UN ALLEVAMENTO SUINO

ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE ERADICATION PROGRAM IN A PIG HERD

ARIOLI E.[2], CALEFFI A.[2], LUPPI A.[1], BONILAURI P.[1], MAIOLI G.[1], DOTTORI M.[1], MARCO E.[3]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

[2] *Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano,* [3] *marco i collell s.l. Barcellona*

Parole chiave: *Actinobacillus pleuropneumoniae,* eradicazione, suino

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae,* eradication, pig

RIASSUNTO

Gli Autori descrivono i risultati dell'applicazione di un programma di eradicazione per *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) in un allevamento suino italiano, dove la pleuropolmonite da APP costituiva il problema più importante dal punto di vista delle perdite sul ciclo produttivo. Nell'allevamento in esame un ceppo di APP biotipo 1 sierotipo 9 è stato ripetutamente isolato nel periodo 2005-2008. Nello stesso periodo, le indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi nei confronti di APP, hanno sempre evidenziato elevate sieroprevalenze negli animali di tutte le categorie produttive. Il programma di eradicazione ha previsto l'impiego del depopolamento parziale delle scrofe e completo degli animali al di sotto di 10 mesi d'età; inoltre è stato associato a vari trattamenti antibiotici con enrofloxacin e fluorfenicolo nelle scrofe e con tulatromicina nei suinetti. Gli antibiotici impiegati sono stati scelti sulla base dei risultati delle MIC (minima concentrazione inibente) eseguite sul ceppo di APP ripetutamente isolato. II livello di biosicurezza è stato valutato all'inizio del programma di eradicazione ed implementato durante tutto il suo svolgimento, con lo scopo di ridurre il rischio di reintroduzione di APP nell'allevamento. I rilievi clinici e di laboratorio dopo l'inizio del programma di eradicazione non hanno evidenziato la circolazione di APP nell'allevamento stesso. I risultati dell'applicazione della griglia SPES (sistema di valutazione delle pleuriti al macello), su polmoni provenienti da partite di suini prima e dopo l'attuazione del programma di eradicazione, hanno evidenziato rispettivamente una elevata incidenza delle pleuriti dorso-caudali, fortemente indicative di precedenti pleuropolmoniti da APP (grado 2,3 e 4) nei primi e la totale assenza nei secondi. I dati produttivi dell'allevamento (indice di conversione, omogeneità delle partite al macello, durata del ciclo produttivo, ecc.) hanno subito un notevole miglioramento in seguito all'applicazione del programma di eradicazione.

ABSTRACT

The Authors describe the *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) eradication program application results in a pig Italian herd in which APP disease had a very important economic impact reducing pig production. From 2005 to 2008 APP biovar 1 serotype 9 was isolated repeatedly from the herd and a very high seroprevalence for APP was observed. The

eradication program used partial depopulation of sow and a complete depopulation of animal under 10 months of age, coupled with treatment with enrofloxacin and fluorfenicol in sow and tulatromycin in piglets. The antimicrobials were selected on the basis of MIC (minimal inhibitory concentration) results of APP strain isolated in the herd. The level of bio-security was considered before eradication and implemented during the program application, in order to reduce the risk of APP reinfection in the herd.
Twelve months after the starting of the eradication program, the clinical and laboratory findings suggested that the APP eradication had succeeded in this herd. The comparative application and results of slaughterhouse pleurisy evaluation system (SPES) on lungs belonging to batches of pigs before and after the application of the eradication program showed a high and absent incidence of pleural lesions associated to APP infection (grade 2, 3 and 4) respectively. Production data showed an improvement after the eradication program application.

INTRODUZIONE

Actinobacillus pleuropneumonie (APP) è l'agente eziologico della pleuropolmonite suina, una malattia respiratoria molto diffusa tra gli allevamenti suini del nord Italia, dove si producono animali fino ad un peso di 160 Kg ed oltre. APP è classificato in due biotipi, di cui il primo nicotinammide adenine dinucleotide – NAD dipendente e in 15 sierotipi. Ogni sierotipo è in grado di produrre diverse tossine denominate ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV, considerate i principali fattori responsabili delle lesioni necrotico-emorragiche caratteristiche della pleuropolmonite suina. In generale i ceppi di APP appartenenti ai sierotipi 1,5,9 e 11 producono le tossine ApxI e ApxII; quelli inclusi nei sierotipi 2,3,4,6,8 e 15 producono la tossina ApxII ed ApxIII; i ceppi appartenenti ai sierotipi 7,12 e 13 solo la tossina ApxII e infine i sierotipi 10 e 14 producono esclusivamente la tossina ApxI. La tossina ApxIV, caratterizzata da lieve attività emolitica, viene invece prodotta da tutti i sierotipi. La variabilità nelle caratteristiche di virulenza tra i ceppi appartenenti a diversi sierotipi sarebbe da relazionare alla capacità di questi di produrre le tossine sopraccitate.
Esistono tuttavia delle differenze in termini di virulenza all'interno dello stesso sierotipo, come ad esempio si osserva per il sierotipo 2 (i ceppi francesi ad alta virulenza differiscono da quelli isolati in Canada e USA che sono caratterizzati da bassa virulenza) o per il sierotipo 3, ad alta virulenza in Gran Bretagna e a bassa virulenza in altri paesi Europei. La malattia è stata descritta in tutta Europa così come negli Stati Uniti, Canada, Messico, Sud America, Giappone e Australia (Sørensen et al., 2006) con prevalenze dei singoli sierotipi che differiscono a seconda delle aree geografiche considerate. Per quanto riguarda l'Italia i sierotipi isolati con maggiore frequenza sono il 2, il 7 ed il 9 (dati non pubblicati).
APP è responsabile di gravi forme cliniche acute, caratterizzate da elevata mortalità negli animali colpiti, tuttavia il superamento della fase acuta comporta lo sviluppo di lesioni croniche che si manifestano come gravi pleuriti fibrose a localizzazione dorso-caudale, che compromettono seriamente la carriera produttiva dell'animale (Sørensen et al., 2006; Pinton et al., 1993). Uno dei principali problemi nel controllo della malattia è costituito dalla gravità delle lesioni che rendono inefficaci i trattamenti con antibiotici verso cui APP mostra sensibilità in vitro. Oltre ai quadri clinici descritti precedentemente è possibile incontrare la forma sub-clinica, in cui gli animali non presentano i caratteristici sintomi né le suggestive lesioni anatomopatologiche polmonari al macello. L'identificazione degli allevamenti che presentano la forma sub-clinica è di fondamentale importanza per il controllo della malattia, considerando che la presenza di animali portatori costituisce la principale fonte di trasmissione dell'infezione tra gli allevamenti.
APP è da considerare probabilmente uno dei patogeni che presenta il maggior impatto

economico sulla suinicoltura mondiale. Le perdite economiche causate da APP sono il risultato della somma di numerosi fattori come l'aumento della mortalità in allevamento, la riduzione della crescita degli animali con conseguente mancata uniformità delle partite colpite, lo scadente indice di conversione dell'alimento e l'incremento dei costi per i trattamenti terapeutici e profilattici (Losinger, 2005).
Sebbene le misure più appropriate per il controllo della malattia, sia da un punto di vista sanitario che economico siano ancora materia di discussione, è possibile distinguerle in tre grandi gruppi: interventi terapeutici mirati, protocolli di vaccinazione e piani di eradicazione, in quest'ultimo caso seguendo l'esempio di paesi del Nord Europa che già da alcuni anni hanno intrapreso la strada dell'eradicazione per importanti patologie batteriche come la dissenteria emorragica da *Brachyspira hyodysenteriae*, l'ileite da *Lawsonia intracellularis*, la polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae* e la pleuropolmonite da APP.
Nel presente lavoro si riporta l'esperienza condotta nell'eradicazione di APP in un allevamento suino, descrivendo le operazioni condotte nel raggiungimento dell'obiettivo ed i dati preliminari sui benefici ottenuti in termini produttivi ed economici.

MATERIALI E METODI

Allevamento

L'azienda oggetto del presente lavoro era composta da una entità produttiva in cui venivano allevate 1100 scrofe, 2000 capi in svezzamento, 1800 capi "in messa a terra", 1600 capi in magronaggio e 4500 animali all'ingrasso. Inoltre l'azienda era ed è dotata di un sito 2 da 1900 capi ubicato a circa un km dalla scrofaia e da due siti 3, il primo ospitante 1700 capi ed il secondo 3000 capi a circa 5 km dall'azienda principale.
La gestione della scofaia, nel periodo precedente l'applicazione del protocollo di eradicazione di APP era in banda settimanale e lo svezzamento a 28 giorni portava alla produzione di lotti da 500 suinetti che per 4 settimane alimentavano gli svezzamenti e successivamente le strutture di magronaggio ed ingrasso interni alla scrofaia e per le 4 settimane successive il sito 2 esterno e le strutture di ingrasso e magronaggio dei siti 3 esterni. L'azienda praticava esclusivamente un'auto-rimonta interna e anche la produzione di seme per la fecondazione artificiale era affidata ad un centro verri aziendale composto da 8 animali.
In tutte le strutture veniva praticato il tutto-pieno/tutto-vuoto per settore o capannone evitando quindi il flusso continuo, in modo da ridurre il rischio delle infezioni intra-gruppi da APP.

Piano vaccinale e strategie di controllo di APP pre-eradicazione

Nell'allevamento veniva praticato un piano vaccinale nei confronti di APP che ha subito nel corso degli anni variazioni di "timing" sia in seguito ad una comparsa più tardiva della forma clinica sia sulla base dei risultati degli screening sierologici longitudinali, atti a verificare la fine della immunità materna nei suinetti. Inizialmente, infatti, veniva attuato un piano vaccinale classico con due interventi, rispettivamente a 6 e 9 settimane di età, in quanto la comparsa della malattia era precoce e cioè intorno a 12/14 settimane di vita. Con il passare del tempo, come accennato, la sintomatologia faceva la sua comparsa sempre più tardivamente e di conseguenza il piano vaccinale è stato modificato spostando i due interventi vaccinali a 14 e 17 settimane. Oltre alla vaccinazione per APP veniva applicato nei suinetti un piano vaccinale nei confronti di *M. hyopneumoniae*, del virus della malattia di Aujeszky e nell'ultimo anno anche di *Circovirus* tipo 2. Nella scrofaia un piano vaccinale mirato prevedeva interventi per rinite atrofica, mal rosso e parvovirosi ed una vaccinazione a tappeto trimestrale per malattia di Aujeszky e PRRS.
L'allevamento praticava il tutto-pieno/tutto-vuoto per settore o capannone, con annessa "welcome therapy" impiegando trattamenti antibiotici "intermittenti" ad attività batteriostatica

nei confronti di APP durante le fasi di magronaggio. Quest'ultima pratica aveva lo scopo di permettere la circolazione del patogeno con conseguente infezione degli animali e la produzione da parte di questi di anticorpi specifici senza che si manifestasse la forma clinica.

Diagnosi della malattia ed indagini pre e post-eradicazione
Nell'allevamento in questione la pleuropolmonite da APP era storicamente presente e negli ultimi anni la sua incidenza aveva mostrato un incremento, sino a diventare il problema più importante dal punto di vista delle perdite sul ciclo produttivo. Nel periodo pre-eradicazione sono stati impiegati metodi diagnostici diretti ed indiretti, per conoscere la natura e l'entità del problema sanitario, gli stessi impiegati durante e dopo l'applicazione del protocollo di eradicazione per mantenere monitorata la situazione sanitaria dell'allevamento. Le indagini sopraccitate sono state condotte presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Sezioni di Reggio Emilia, Mantova e Parma.
La ricerca di APP è stata eseguita attraverso la semina, su apposito terreno colturale, di materiale patologico prelevato da polmoni presentanti caratteristiche lesioni riferibili a pleuropolmonite fbrino-necrotico-emorragica (nel periodo pre-eradicazione) e su tutti i polmoni di animali morti con sintomatologia respiratoria (periodo post-eradicazione) (tabella 1). L'esame colturale è stato eseguito, come da procedure standardizzate presso i laboratori dell'IZSLER, su agar sangue addizionato con nicotinammide adenine dinucleotide – NAD e successiva incubazione in termostato a CO2 alla temperatura di 37°C per 48 ore. Dopo opportuna incubazione le colonie tipiche, per morfologia riferibili ad APP, sono state sottoposte ai seguenti test di conferma:
-valutazione microscopica tramite colorazione di Gram;
-test biochimici (test dell'ureasi, della fermentazione del trealosio e mannitolo secondo metodica standardizzata);
-test microbiologico (semina su agar siero per la determinazione del biotipo).
Per la determinazione del sierotipo è stata impiegata una metodica di sieroagglutinazione impiegando anti-sieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei singoli sierotipi di APP. Dai ceppi di APP isolati è stata testata la sensibilità agli antibiotici attraverso l'allestimento di antibiogrammi e MIC (minima concentrazione inibente) impiegando metodiche standardizzate presso la Sezione di Parma dell'IZSLER.

Tabella 1: Numero totale di conferimenti (polmoni/carcasse) inviati con anamnesi di patologia respiratoria presso l'IZSLER provenienti dall'allevamento in esame dal 2005 al 2009.
Table 1: Samples sent to the IZSLER laboratories with respiratory medical history from 2005 to 2009.

ANNO*	N° conferimenti	N° di polmoni/ carcasse
2005	5	23
2006	6	11
2007	5	5
2008	10	25
2009	1	5

Le indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi nei confronti di APP sono state eseguite durante il periodo 2005-2009 impiegando differenti kit ELISA:

- test ELISA indiretta HIPRA che effettua una rilevazione anticorpale senza differenziazione dei sierotipi fornendo un risultato qualitativo (positivo-negativo);
- il test ELISA indiretta BOMMELI/IDEXX che evidenzia anticorpi nei confronti della tossina Apx-IV e che fornisce sempre un risultato qualitativo;
- kit ELISA indiretta Vetquinol in grado di fare una parziale sierotipizzazione in quanto riunisce i sierotipi 1-9-11, i sierotipi 4-7 ed il sierotipo 2 rispettivamente in tre differenti kit.

I prelievi di sangue sono stati effettuati negli animali presenti nel magronaggio, nell'ingrasso e nei riproduttori. Nella tabella 2 si riporta il dato relativo ai campioni di sangue sottoposti ad indagini sierologiche nei periodi pre e post-eradicazione.

Tabella 2: Numero totale di conferimenti per indagini sierologiche inviati presso l'IZSLER, provenienti dall'allevamento in esame dal 2005 al 2009.
Table 2: Blood samples sent to the IZSLER laboratories for APP serological investigation from 2005 to 2009.

	ESAMI SIEROLOGICI PER APP	
ANNO*	N° prelievi	N°campioni
2005	6	200
2006	6	132
2007	8	442
2008	5	130
2009	7	204

*Periodo 2005-2008 pre-eradicazione; 2009 post-eradicazione

Sia nelle fasi precedenti sia in quelle successive all'applicazione del protocollo di eradicazione sono state valutate al macello le lesioni pleuriche croniche utilizzando il metodo recentemente implementato e denominato "SPES" (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System - Sistema di valutazione al macello delle pleuriti) (Dottori et al., 2007 e 2008; Merialdi et al., 2008). La griglia S.P.E.S. è stata applicata nel 2005 a 428 polmoni, nel 2007 a 101 polmoni e nel 2009 a 279 polmoni, con la valutazione nella stessa seduta di due partite composte da 144 e 135 polmoni provenienti rispettivamente da uno degli allevamenti che ospitava ancora animali positivi e dal sito APP free.
Il metodo S.P.E.S. impiegato 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 3).

Tabella 3: Griglia di valutazione S.P.E.S. in sintesi.

Table3: The S.P.E.S. grid for chronic pleurisy (CP) score.

Punteggio	Lesione
0	Assenza di lesioni
1	Lesioni pleuriche di tipo aderenziale tra le porzioni crani ventrali dei lobi anteriori, intermedi e diaframmatici, oppure aderenza di modesta entità, monolaterale e 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.

Dati produttivi dell'allevamento

I dati produttivi dell'allevamento nel periodo pre-eradicazione erano pesantemente condizionati dalla malattia respiratoria determinata da APP che inesorabilmente colpiva tutti i lotti in produzione. Inoltre il danno negli ultimi anni era aggravato dal fatto che la malattia faceva la sua comparsa a pesi molto elevati, non prima degli 80 kg, causando quindi un danno economico particolarmente rilevante. Durante gli episodi di malattia era "normale" avere un 10% di mortalità e praticamente un arresto dell'accrescimento di almeno 20/30 giorni, era infatti molto frequente che le partite necessitassero di almeno 310 giorni di vita per poter essere vendute. Inoltre gli animali dei lotti colpiti restavano fortemente disomogenei con conseguenti difficoltà al momento del carico per il macello.

Piano di eradicazione

Il piano di eradicazione si è basato sull'applicazione di tre principi fondamentali:

- il depopolamento parziale dell'allevamento;
- il trattamento antibiotico degli animali;
- l'applicazione di rigide misure di biosicurezza, compreso il monitoraggio della situazione sanitaria dell'allevamento e il ripopolamento con l'immissione di animali "patogen free" in azienda.

Nell'applicazione del depopolamento parziale, siccome l'azienda praticava un piano di auto-rimonta, per ovviare al rischio di mantenere in allevamento animali di età inferiore a 10 mesi e quindi probabili eliminatori, si decise di eliminare tutti gli animali che non avessero raggiunto questa età al momento dell'inizio del piano di eradicazione. Si decise inoltre di

eliminare i verri impiegati per la produzione del seme passando quindi all'acquisto del seme da una struttura esterna. Sempre in questo contesto l'azienda decise di passare dal sistema di gestione a banda settimanale a quella tri-settimanale, questo sia per mantenere lotti di una certa consistenza che per aumentare la distanza di età tra i lotti riducendo il rischio delle infezioni orizzontali. Con lo scopo di ottenere il completo svuotamento dell'azienda principale nel giro di 9 mesi, i suinetti svezzati vennero trasferiti esclusivamente nel sito 2 esterno. A questo scopo l'azienda venne trasformata in un sito 1, passando da 1100 a 450 scrofe in quanto la capacità dei siti esterni non era in grado di accogliere la produzione di un numero superiore di scrofe. Questa operazione ha consentito la trasformazione dell'azienda da ciclo chiuso ad unico sito in un'azienda multisede.
Nel corso dell'attuazione del piano di eradicazione, la proprietà decise di acquistare un ulteriore sito della capacità di 2000 capi svezzamento, 1200 capi magronaggio e di 6000 capi ingrasso. Questo nuovo sito, che potremmo definire 2/3, fu impiegato per accogliere i suinetti nati dal momento dell'eradicazione in poi.
Eseguito il de popolamento (giorno 0), iniziò all'interno dell'azienda (sito 1), dove erano rimasti esclusivamente le scrofe, i verri "ruffiani" ed i suinetti lattanti, un trattamento antibiotico con le modalità di seguito indicate:
-giorno 0: somministrazione per via IM di 5 mg/kg di enrofloxacin in tutte le scrofe e di 2,5 mg/kg di tulatromicina nei suinetti.
-giorno 5: somministrazione per via IM di 5mg/kg di enrofloxacin in tutte le scrofe
-giorno 10: somministrazione per via IM di 2,5 mg/kg di tulatromicina in tutti i suinetti
-allo svezzamento dei suinetti: somministrazione per via IM di 2,5 mg/kg di tulatromoicina negli svezzati.
Per ottimizzare e facilitare le operazioni di somministrazione dei farmaci tutte le scrofe in box vennero trasferite in gabbia singola. Il giorno 0, oltre al trattamento per via parenterale, negli animali in gestazione iniziò anche un trattamento antibiotico con fluorfenicolo al dosaggio di 10 mg/kg di p.v. per via orale attraverso il mangime della durata di 10 giorni. Questo trattamento è stato previsto per ovviare ad eventuali sviste o dimenticanze, che avrebbero potuto portare alla mancata somministrazione parenterale della terapia ad alcuni animali.
La scelta degli antibiotici da somministrare per il programma di eradicazione è stata guidata dai risultati delle MIC eseguite presso la Sezione di Parma (IZSLER), su ceppi di APP isolati da 6 conferimenti di polmoni di animali morti per pleuropolmonite (vedi risultati). Oltre al dato fornito dalla MIC è stata considerata la capacità battericida del prodotto nei confronti di APP, nonchè il volume di inoculo per kg di peso vivo (per facilitarne la somministrazione nelle scrofe) e l'azione long-acting della molecola scelta (per ridurre il numero di interventi da praticare nei suinetti).
La scelta della molecola da somministrare per os è stata condizionata, oltre che dal valore della MIC, dalla sua disponibilità come forma farmaceutica e dalla esperienza aziendale di efficacia sul patogeno negli episodi di malattia manifesta. Allo scopo di preservare il sito 1 da eventuali reinfezioni causate dall'introduzione di APP dai siti esterni, nei quali erano ancora presenti animali che presentavano la forma clinica, venne recintata tutta la scrofaia per evitare l'entrata al personale non addetto. Venne predisposto inoltre che anche i silos del mangime venissero riforniti dall'esterno e venne attuata una formazione sul personale sul tema della biosicurezza perché dopo l'eradicazione sarebbero coesistiti 3 siti contenenti animali potenzialmente infetti da APP e il sito 1 con animali APP "free", andando a sottolineare l'assoluta necessità per tutti di cambiarsi gli indumenti e le calzature ed evitare di entrare nel sito 1 se in precedenza si era visitato uno dei siti esterni. Completato il trattamento antibiotico sono state acquistate circa 750 scrofette "free" da *Herpesvirus* della malattia di Aujeszky, PRRSV ed APP.

RISULTATI

Nell'allevamento in esame, come già accennato in precedenza, il "problema" pleuropolmonite era storicamente presente, come confermato dai dati relativi agli isolamenti di APP eseguiti presso l'IZSLER nel periodo pre-eradicazione considerato (2005-2008) (tabella 4). Da metà marzo 2009, nel sito 2/3 di nuova acquisizione che riceve i suinetti prodotti nel periodo successivo all'eradicazione non sono state osservate manifestazioni cliniche o lesioni anatomopatologiche riferibili a pleuropolmonite da APP. A confortare questo dato si aggiunge che dal raggiungimento dello stato di eradicazione della pleuropolmonite, l'unico focolaio di malattia respiratoria osservato è stato monitorato inviando materiale patologico presso i laboratori dell'IZSLER per indagini batteriologiche. Queste ultime non hanno evidenziato la presenza di APP.

Tabella 4: Ceppi di APP isolati da polmoni/carcasse inviati con anamnesi di patologia respiratoria presso l'IZSLER provenienti dall'allevamento in esame e suddivisi per anno.
Table 4: APP strains isolated from samples sent to the IZSLER laboratories with respiratory medical history from 2005 to 2009.

ANNO	N° conferimenti	N° di polmoni/carcasse	Isolamento di APP*
2005	5	23	(3) biotipo 1 sierotipo 2, 9, 7
2006	6	13	(7) biotipo 1 sierotipo 9
2007	5	5	(2) biotipo 1 sierotipo 9
2008	10	25	(5) biotipo 1 sierotipo 9
2009	1	5	-

* Indicato tra parentesi il numero di isolamenti di ceppi di APP per anno.

Come è possibile osservare dall'analisi della tabella 4 il sierotipo di APP isolato negli ultimi tre anni nell'allevamento in esame è stato esclusivamente il 9, biotipo 1. Questo ceppo è stato impiegato per l'allestimento delle MIC che in base ai risultati forniti hanno permesso la scelta degli antibiotici impiegati nel protocollo di eradicazione.
Nel periodo 2005-2008 i risultati delle indagini sierologiche per la ricerca di APP hanno evidenziato una attiva circolazione del patogeno con sieroprevalenze dell'80-90% negli animali nella fase di magronaggio (50-70 kg) e nella fase di ingrasso (80-120 kg). La positività sierologica per APP raggiungeva prevalenze del 100% nella popolazione dei riproduttori e di conseguenza si osservava la presenza di anticorpi colostrali fino a 70-100 giorni di vita nel 90-100% dei suinetti.
Per quanto riguarda i risultati delle indagini sierologiche successivamente al raggiungimento dell'eradicazione si sottolinea come nelle 7 sessioni di prelievi eseguiti a partire dal mese di luglio 2009 su partite di animali di 150 giorni d'età non è mai stata evidenziata la presenza di anticorpi nei confronti di APP. Inoltre i controlli sierologici eseguiti sulle scrofette APP free introdotte nel sito 1 e quindi conviventi con la popolazione di scrofe che hanno subito i trattamenti antibiotici previsti dal protocollo di eradicazione non hanno presentato né manifestazioni cliniche né sieroconversioni per APP.
Nel periodo pre-eradicazione la valutazione delle lesioni pleuriche e l'applicazione della griglia S.P.E.S. su 3 partite di suini al macello, ha evidenziato una elevata incidenza delle pleuriti dorso-

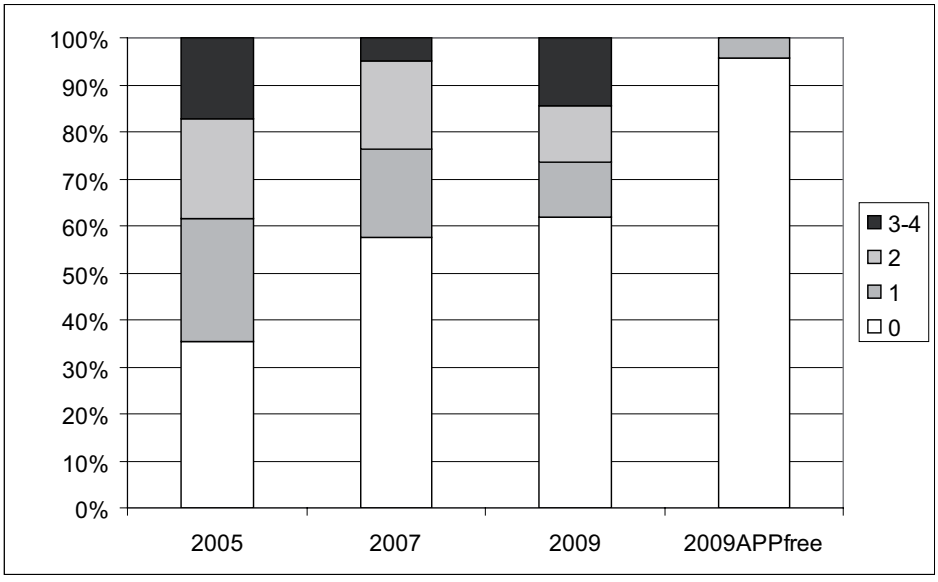
caudali di classe 2, 3 e 4 da considerarsi come il risultato della cronicizzazione di pleuropolmoniti da APP. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti dallo score polmonare eseguito dopo l'eradicazione su animali che ancora provenivano dai siti che contenevano animali "non APP free".
A conferma del risultato conseguito con l'eradicazione appare interessante confrontare gli indici SPES ed APPI tra le partite di polmoni di suini appartenenti ai gruppi sopraccitati con le prime 2 partite provenienti dal sito APP free.
Confrontando gli indici APPI e SPES indicati nella tabella 5 si può evidenziare come sussistano differenze statisticamente significative tra le partite APP "free" e quelle non APP "free".

Tabella 5: Risultati dell'applicazione della griglia S.P.E.S. e del calcolo degli indici SPES ed APPI tra le partite esaminate nel periodo 2005-2009.
Table 5: S.P.E.S grid results and correlations among SPES/APPI values between batches evaluated from 2005 to 2009.

Anno	SPES media	APPIndex
2005	1,26[a]	1,02
2007	0,71[b]	0,52
2009	0,81[b]	0,68
2009 free	0,04[c]	0

[a,b,c]=a lettera differente corrisponde differenza statisticamente significativa nella media SPES, $p<0.01$ test Kruskal-Wallis.

Grafico 1. Distribuzione cumulata in colonna di tutti i polmoni analizzati tramite griglia S.P.E.S. nell'allevamento in esame nel periodo 2005-2009.
Figure 1. Distribution of pleural scores (S.P.E.S. grid) of lungs belonging to pigs of the herd from 2005 to 2009.



L'ultimo anno prima dell'eradicazione di APP l'allevamento ha svezzato circa 22000 suini e di questi circa 17800 sono arrivati ad essere venduti al macello (perdita del 20% circa). L'80% della mortalità totale si verificava nella fase di ingrasso dai 70 kg ai 160 kg, mentre il restante 20% avveniva durante le fasi di svezzamento e prima fase di magronaggio. Ovviamente la causa di una così alta mortalità all'ingrasso non era solo imputabile ad APP, tuttavia la pleuropolmonite era responsabile di circa il 70% della mortalità totale all'ingrasso, ovvero il 10,5% sul ciclo mentre le altre cause rappresentavano solo il 30%, ovvero il 5,5% della mortalità sul ciclo. Alle perdite dovute all'elevata mortalità negli animali da 70 kg fino al peso di macellazione si aggiunga la riduzione degli incrementi ponderali giornalieri negli animali che superavano la forma acuta della malattia e la formazione di partite disomogenee, con conseguenti deprezzamenti e detrazioni al macello.
La prima partita APP free arrivata alla fine del ciclo produttivo, ha avuto una percentuale di perdite totali (morti e scarti) sul ciclo del 5,2%, un accrescimento medio giornaliero dal giorno dello svezzamento alla consegna della partita di 0,66 kg e un peso medio di vendita di 163 kg. Il secondo lotto ha conseguito una percentuale di perdite del 7,7%, un accrescimento medio giornaliero di 0,66 kg e un peso medio di 163,9 kg. A questo va aggiunto che le partite hanno avuto una ottima uniformità di peso alla macellazione, in quanto il 95.4% delle carcasse erano all'interno della finestra di peso ottimale per il macello, questo senza praticare selezione dei soggetti al momento del carico. A questo va aggiunto che le performances di crescita ottenute negli animali provenienti dal sito 1 dopo l'eradicazione di APP hanno permesso di ridurre di circa 5 settimane la durata del ciclo produttivo se comparato alla produzione nel periodo pre-eradicazione. Sebbene non sia stato possibile eseguire una valutazione statistica dei dati a disposizione prima e dopo l'eradicazione, appare evidente un consistente miglioramento dei parametri produttivi nel secondo periodo rispetto al primo.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono stati riportati i risultati del piano di eradicazione per APP applicato ad un allevamento suino del Nord Italia. Dall'analisi di questi appare importante sottolineare gli aspetti sanitari, gestionali ed economici connessi all'applicazione del piano sopraccitato.
Dal punto di vista prettamente sanitario è importante sottolineare come la presenza di APP nell'allevamento in esame avesse un notevole impatto sulle perdite totali dell'allevamento, influenzando inoltre la produzione fino alla macellazione con ritardi nella crescita degli animali e la presenza di partite di suini disomogenee al macello. Occorre sottolineare che tutti gli interventi terapeutici e di profilassi praticati fino al momento dell'eradicazione non avevano sortito risultati soddisfacenti e che l'intervento di eradicazione, nel caso specifico era probabilmente rimasta l'unica soluzione nonostante i costi necessari per la sua messa in opera. L'applicazione congiunta del depopolamento parziale dell'allevamento, di un trattamento antibiotico mirato e l'applicazione di rigide misure di biosicurezza, compreso il monitoraggio della situazione sanitaria dell'allevamento e l'immissione di animali "patogen free" in azienda hanno permesso di raggiungere l'obiettivo eradicazione, come evidenziato dalle indagini ciniche, anatomopatologiche, batteriologiche e sierologiche che hanno dimostrato l'assenza di circolazione di APP negli animali svezzati dal raggiungimento dell'eradicazione ad oggi. Occorre tuttavia molta cautela nel considerare il risultato raggiunto come definitivo, trattandosi in realtà di una situazione in continua evoluzione, anche in relazione ad alcuni aspetti legati all'epidemiologia della malattia. Questi ultimi, come la presenza di carriers, animali infetti ma sub-clinici che albergano APP a livello delle prime vie respiratorie e delle tonsille, così come l'esistenza di animali infetti ma sieronegativi, descritta più volte in letteratura, possono essere alla base della reintroduzione del patogeno in allevamento (Fittipaldi N. et al, 2003; Chiers K. Et al., 2002).

In questo contesto anche l'applicazione ed il mantenimento di attente misure di biosicurezza sono da ritenersi una condizione fondamentale per evitare la reintroduzione del patogeno dopo l'eradicazione. Tra i diversi fattori di rischio appare importante sottolineare la tipologia di allevamento, in quanto gli allevamenti da ingrasso o gli allevamenti a ciclo chiuso che acquistano comunque una certa percentuale di animali dall'esterno da destinare all'ingrasso, sono soggetti ad un rischio maggiore di introduzione di APP dopo l'eradicazione. Questo può portare ad un flusso di animali infetti o potenzialmente tali tra le strutture invianti e quelle che ricevono gli animali. Al contrario le aziende a ciclo chiuso che producono autonomamente gli animali da destinare all'ingrasso, come l'allevamento oggetto del lavoro, sono soggette ad un rischio di reintroduzione inferiore rispetto ad altre tipologie di allevamento (Hege R. et al., 2002). Un'altro punto critico alla base della possibile reintroduzione di APP in allevamento dopo l'eradicazione è legato al trasporto degli animali. I mezzi di trasporto, a seconda della tipologia di allevamento, vengono a contatto con le strutture dell'azienda in più momenti del ciclo produttivo (scarico animali da destinare all'ingrasso, carico di animali da trasportare al macello ecc.). A questo proposito sono di fondamentale importanza le pratiche di disinfezione e pulizia dei mezzi di trasporto e delle strutture dell'allevamento (Hege R. et al., 2002).
Per quanto riguarda le performances di crescita ottenute negli animali provenienti dal sito 1 dopo l'eradicazione di APP si sottolinea l'importanza dell'accorciamento del ciclo produttivo, permettendo di sfruttare in modo più efficace le strutture da ingrasso e di conseguenza di ottenere un abbassamento dei costi fissi che gravano su ogni capo prodotto. Purtroppo non è stato possibile verificare quanto sia il miglioramento relativo alla conversione alimentare, ma vista la notevole riduzione del numero di giorni necessari per raggiungere il peso di macellazione è possibile stimare un recupero di 0.3/0.4 punti di indice di conversione, che corrispondono a 110/120 kg di mangime consumati in meno per raggiungere lo stesso peso. Un altro enorme vantaggio che si è ottenuto grazie alla eradicazione è sicuramente l'abbattimento dei costi dei trattamenti di profilassi vaccinale e dei trattamenti antibiotici sia di massa che singoli, visti non solo dal punto di vista del puro costo dei prodotti utilizzati ma anche dalla riduzione del numero di ore di lavoro che la pratica dei trattamenti iniettabili comporta. Inoltre visto l'età avanzata a cui i capi venivano colpiti non erano infrequenti i ritardi di consegna al macello per rispettare i tempi di sospensione dei trattamenti terapeutici.
In conclusione, l'eradicazione di importanti patologie batteriche come la pleuropolmonite, che incidono negativamente sulla produzione di numerose aziende suinicole, può rappresentare una soluzione applicabile e di successo quando le misure "classiche" di controllo di tali patologie, come la vaccinazione e l'impiego di trattamenti terapeutici mirati non sono in grado di sortire effetti soddisfacenti. Occorre comunque sottolineare come queste misure, definite "classiche" che permettono di stabilizzare lo stato sanitario degli animali siano, unitamente a piani di biosicurezza e di monitoraggio, fondamentali per il raggiungimento dell'eradicazione stessa.

BIBLIOGRAFIA

1. Chiers, K., E. Donne, I. Van Overbeke, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.2002. Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. Vet. Microbiol. 88:385–392.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Fittipaldi N.,Broes A. Harel J., Kobisch M., Gottschalk M. (2003). Evaluation and Field Validation of PCR Tests for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Subclinically Infected Pigs. Journal of Veterinary Microbiology, 41:5085-5093.
7. Hege R., Zimmermann W., Scheidegger R., Stärk K.D.C. (2002) Incidence of Reinfections with Mycoplasma hyopneumoniae and Actinobacillus pleuropneumoniae in Pig Farms Located in Respiratory-Disease-Free Regions of Switzerland – Identification and Quantification of Risk Factors. Acta vet. scand. 2002, 43, 145-156.
8. Losinger W.C. (2005). Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of Actinobscillus pleuropneumonies on grower/finisher swine operations in the United States. Prevenetive Veterinary Medicine, 68:181-193.
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. Moller, K., L. V. Andersen, G. Christensen, and M. Kilian. 1993. Optimalization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet. Microbiol. 36:261–271.
11. Sidibe, M., S. Messier, S. Lariviere, M. Gottschalk, and K. R. Mittal. 1993. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. Can. J. Vet. Res. 57:204–208.
12. Sørensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006) Diseases of the respiratory system. In: Diseases of Swine, 9th ed., p. 149-177.
13. 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.
14. E. Nielsen, K.K.Kongsted and N. van Aken. (2002) Attempted elimination of *Actinobacillus pleuropneumoniae (serovar 2&6)* Mycoplasma hyopneumoniae and PRRS-eu by depopulation and tilmicosin treatment. Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa USA, June 2-5 ,2002; vol. 1: p. 276.
15. K. Chiers, E. DonnŽ, I. Van Overbeke, R. Ducatelle and F. Haesebrouck. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa USA, June 2-5 ,2002; vol. 1: p. 181.
16. M-T Chiou, S-P Chen, K-S Yeh, C-E Tsai. Antimicrobial susceptibility and MIC of swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* . Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa USA, June 2-5 ,2002; vol. 2: p. 6.

Virbac
SALUTE ANIMALE

Una sola **passione** : la salute animale

VIRBAC S.r.l.
via Caldera, 21 • 20153 Milano • Italia
Tel. 02 4092471 • Fax 02 40924777
www.virbac.it