

Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS  
nel 2011 i svolgono grazie al contributo di:

- ASCOR CHIMICI
- BAYER ANIMAL HEALTH
- BOEHRINGER INGELHEIM
  - CALIER ITALIA
  - CEVA VETEM
  - CHEMIFARMA
  - DOX-AL ITALIA
- ELANCO ANIMAL HEALTH
- ESTEVE VETERINARIA
  - FATRO
  - HIPRA ITALIA
- INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TRE I
- INTERVET/SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH
  - JANSSEN-CILAG
  - Merial ITALIA
- NOVARTIS ANIMAL HEALTH
  - PFIZER ITALIA
  - VIRBAC

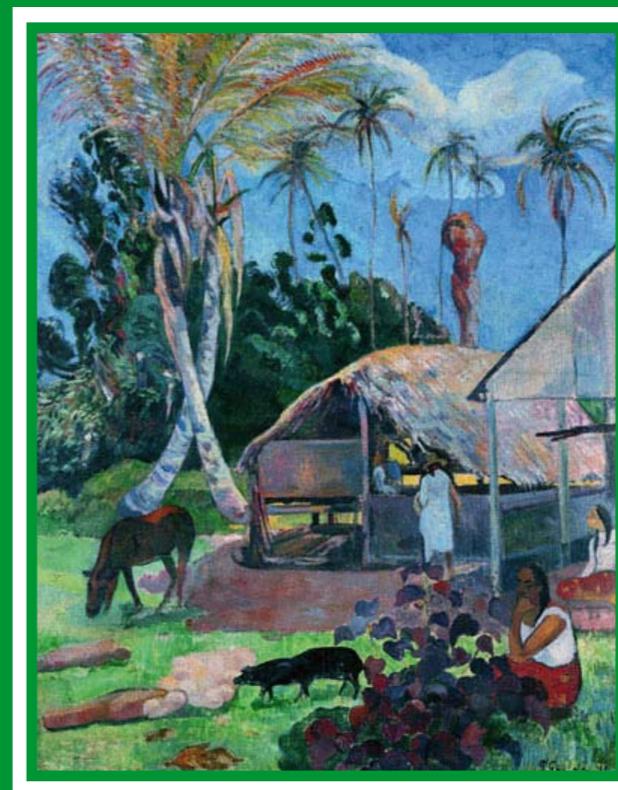
ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI 2011



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA  
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

## ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

**2011**



XXXVII  
MEETING ANNUALE  
*Piacenza*





SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

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

**2011**

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini  
XXXVII Meeting Annuale, Piacenza, 24-25 Marzo 2011.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale S.p.A. in Parma nel mese di Marzo 2011.

ISBN 978-88-903311-3-8

## INDICE

Prefazione ..... p. 21

### ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

*Bardolino, 14 Maggio 2010*

*Gusmaroli G.* La produzione suinicola nazionale e possibili strategie per un suo valore aggiunto ..... p. 25

### ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

#### LA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO IN MEDICINA SUINA

*Marmirolo (MN), 8 ottobre 2010*

*Guazzetti S.* La valutazione critica dei test diagnostici ..... p. 31

*Luppi A.* Prelievo, conservazione ed invio dei campioni per indagini di laboratorio in patologia suina ..... p. 39

*Bonilauri P.* Diagnostica molecolare di malattie infettive del suino, dalla PCR tradizionale al sequenziamento dell'agente infettivo rilevato ..... p. 48

### ATTI DEL XXXVII MEETING ANNUALE

*Piacenza, 24-25 marzo 2011*

#### TAVOLA ROTONDA

#### RIPRODUZIONE E PERFORMANCE - I

*Peltoniemi O.A.T.* Gestione del parto e dell'inizio della lattazione nella scrofa ad alta prolificità ..... p. 63

#### TAVOLA ROTONDA

#### RIPRODUZIONE E PERFORMANCE - II

*Nauwynck H.* Disordini riproduttivi di origine virale nella scrofa ..... p. 71

*Del Piero F.* Infertilità di origine non infettiva, perdita del prodotto del concepimento e malformazioni nei suini ..... p. 74

## COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Apicella M., Osella E., Gambino F., Migliardi M., Petrarulo M., Alborali M., Zanardi M.G., Salogni C., Bollo E., Guarda F.*  
Ricerche sui depositi vescicali nelle scrofette al macello..... p. 82
- Grattarola C., Massa M., Bellino C., Botta E., Dondo A., Maggi E., Miniscalco B., Varnava' D., Zoppi S., Cagnasso A.*  
Indagine in campo sulla diffusione della cistite della scrofa..... p. 87
- Scollo A., Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Donna R., Gherpelli M.*  
Il lavaggio broncoalveolare (BAL) nel suino: due tecniche a confronto e nuove proposte per un concreto utilizzo di campo..... p. 94
- Baricco G.*  
Cosa è il “bunga bunga”, e perché è così importante per gli allevatori di suini italiani..... p. 103
- Gusmara C., Lauzi S., Andreoni S., Lorenzi V., Barzetti C., Sala V.*  
Caratterizzazione genotipica e sensibilità agli antibiotici degli isolamenti di *Escherichia coli* da infezioni urinarie (uti) delle scrofe..... p. 107
- Rota Nodari S., Guerra O., Sassi M., Nassuato C., Gastaldo A., Della casa G., Archetti I.L., Lombardi G., Candotti P.*  
Validazione di una scheda comportamentale di rilevazione del dolore nei suinetti sottoposti a castrazione..... p. 117
- Di Martino G., Stefani A., Gottardo F., Scollo A., Schiavon E., Capello K., Bonfanti L.*  
Effetto dell'età e del sesso su alcuni parametri ematici correlati allo stress in suini pesanti all'ingrasso..... p. 126
- Candotti P., Rota Nodari S., Diegoli G.*  
Proposta di un piano d'azione per la soppressione del suino in allevamento..... p. 132
- Scollo A., Di Martino G., Prevedello P., Rampin F., Bonfanti L., Gottardo F.*  
Effetto del sesso e dell'età sull'utilizzo di diversi tipi di arricchimenti ambientali in suini pesanti italiani all'ingrasso..... p. 140
- Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Scollo A., Bonilauri P., Donna R., Gherpelli M.*  
Analisi della distribuzione dei ritorni su un campione di 18.000 scrofe nel Nord Italia..... p. 148

- Raffi V., Donna R., Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Scollo A., Bonilauri P., Gherpelli M.*  
Induzione del parto nella scrofa con protocollo farmacologico “ad alta sincronizzazione” ..... p. 157
- Tonon F., Mazzoni C., Borri E., Donna R., Raffi V., Scollo A., Bonilauri P., Gherpelli M.*  
Sindrome della seconda figliata: analisi dei dati su 11 allevamenti in Italia studio preliminare ..... p. 164
- D’Avino M., Cucco L., Ciuti F., Ortenzi R., Paniccià M., Pezzotti G., Staffolani M., Magistrali C.F.*  
Valutazione della contaminazione da *salmonella* spp. lungo la filiera produttiva in cinque allevamenti suini del Centro Italia ..... p. 168
- Galletti E., Merialdi G., Rosignoli C., Mazzaro A., Alborali G., Grassi A., Zanoni MG., Granito G., Guerzoni S., Arioli E., Zavattini S., Franco A., Bonilauri P., Martelli P.*  
Persistenza di *staphylococcus aureus* meticillino resistenti negli ambienti di allevamento dopo pulizia e sanificazione e sulle carcasse suine a fine macellazione ..... p. 177
- Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M. L., Pongolini S., Tamba M., Sozzi E., Vicari N., Merialdi G.*  
Monitoraggio sanitario della popolazione di cinghiali (*sus scrofa*) in Emilia-Romagna. Risultati degli anni 2006-2010 ..... p. 185
- Iodice G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Maioli G., Dottori M., Merialdi G., Leonelli R., Merenda M., Biasi G., Luppi A.*  
Sierotipizzazione di ceppi di *haemophilus parasuis* isolati dal suino nel Nord Italia: aggiornamento dei risultati ..... p. 196
- Maioli G., Corradini C., Bonilauri P., Dottori M., Canelli E., Cantoni A.M., Fontana R, Luppi A.*  
Prevalenza e caratterizzazione genetica di pcv2 in cinghiali abbattuti in provincia di Reggio Emilia ..... p. 203
- Schiavon E., Rampin F., Bortoletto G., Leotti G., Tonon F., Iob L., Drigo M.*  
Efficacia della vaccinazione per circovirus in allevamento con circolazione virale, ma con assenza di casi di PMWS ..... p. 211
- Morandi F., Panarese S., Maserati A., Granito G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Lelli D., Leotti G., Bianchi M., Brunetti B., Ferrara D., Bianco C., Vila T., Joisel F., Ostanello F., Sarli G.*  
Risultati preliminari sull’impiego di un protocollo diagnostico per la valutazione del coinvolgimento del PCV2 nella patologia riproduttiva del suino ..... p. 218

- Dotti S., Ferrari M., Lombardo T., Martinelli N., Razzuoli E., Villa R., Amadori M.*  
Cinetica dello sviluppo della risposta immunitaria in suini sottoposti ad infezione sperimentale con virus della porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS)..... p. 226
- Foni E., Zanni I., Chiapponi C., Leotti G., Vila T.*  
Indagine sierologica nei confronti dei sottotipi H1N1, H1N2 e H2N3 del virus influenzale in allevamenti suini italiani affetti da sindrome respiratoria nell'anno 2009..... p. 230
- Bardini R., Leotti G., Nigrelli A.D., Rosignoli C., Foni E., Sarli G., Morandi F., Galuppini A., Zamperlin D.*  
Descrizione di un focolaio di influenza (A/H1N2) in un allevamento a ciclo chiuso..... p. 234
- Calisesi L. Luppi A., Bianchi M., Sarli G., Gelmetti D., Morandi F., Bonilauri P., Dottori M., Merialdi G.*  
Descrizione di un focolaio di encefalomiocardite in un allevamento suino..... p. 243
- Baricco G., Piovano R.*  
Supplementazione dei mangimi con minime dosi di selenio organico: effetto sulle prestazioni dei suinetti..... p. 250
- Baricco G., Piovano R.*  
Supplementazione dei mangimi con minime dosi di selenio organico: effetto sulle prestazioni di suini in finissaggio..... p. 254
- Catella A., Moreno A., Sozzi E., Lelli D., Boniotti B., Alborali L., Luppi A., Nigrelli D., Fontana R., Cordioli P.*  
Caratterizzazione genomica dei ceppi di Aujeszky isolati in Italia tra il 2000 e il 2010..... p. 258
- Ferrari L., Morganti M., Borghetti P., De Angelis E., Martelli P.*  
Modulazione di citochine pro-infiammatorie e immunitarie in pbmc di suini v accinati e non vaccinati esposti a infezione naturale da circovirus tipo 2 del suino (PCV2)..... p. 266
- Figarolli B.M., Gradassi M., Bonardi S., D'Incau M., Alborali G.L., Tagliabue S.*  
Determinazione del biosierotipo e dei caratteri di virulenza in stipiti di *Yersinia enterocolitica* isolati da suini macellati..... p. 277
- Giacomini E., Ferro P., Nassuato C., Salogni C., Alborali L.*  
Dinamica dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* in 4 allevamenti suini italiani a ciclo chiuso..... p. 286

<i>Guadagnini G., Ferro P., Salvini F., Zanoni MG., Alborali G.L.</i> Analisi della sensibilita' di ceppi di <i>Pasteurella multocida</i> e di <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> a tilmicosina: confronto tra kirby-bauer, mic ed efficacia in campo.....	p. 299
<i>Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M.</i> Griglia spes: aggiornamento sul monitoraggio delle lesioni pleuriche in suini macellati.....	p. 306
<i>Marruchella G., Speranza R.</i> Broncopolmonite verminosa fatale da <i>Metastrongylus elongatus</i> in un suino co-infettato da circovirus suino tipo 2.....	p. 312
<i>Marruchella G.</i> Valutazione quantitativa della muscolatura liscia bronchiolare in polmoni normali e patologici di suino - indagini preliminari.....	p. 317
<i>Nanjiani I.A., Morales J., Piñeiro C., Manso A., Wuyts N., Beccalossi M., Doncecchi P.</i> Uso metafilattico di Draxxin® contro l' <i>Actinobacillus Pleuropneumoniae</i> (app) in forma clinica in suini da ingrasso: confronto con uso di amoxicillina nell'alimento.....	p. 321
<i>Nanjiani I.A., Morales J., Piñeiro C., Manso A., Wuyts N., Beccalossi M., Doncecchi P.</i> Uso metafilattico di draxxin® contro l' <i>actinobacillus pleuropneumoniae</i> (app) in forma clinica in suini da ingrasso: confronto con uso di ossitetraciclina nell'alimento.....	p. 327
<i>Ostanello F., Granito G., Rugna G., Lelli D., Leotti G., Merialdi G., Bianchi M.</i> Valutazione sierologica dell'efficacia di un vaccino anti-pcv2.....	p. 333
<i>Pavesi R., Cevidalli A., Blanchaert A., Cominotti F., Nassuato C., Boniotti B., Alborali L.</i> Profilo sierologico e virologico dell'infezione da PCV2 e PRRSV in 10 allevamenti suini italiani.....	p. 342
<i>Perrone V., Cavallero S., Cito G.</i> Caso di idatidosi in suini d'allevamento regolarmente macellati.....	p. 351
<i>Rugna G., Cevidalli A.E., D'Incau M., Merialdi G.</i> Determinazione della minima concentrazione inibente (mic) di 18 antibiotici nei confronti di <i>Salmonella choleraesuis</i> .....	p. 357

*Sensi M., Feliziani F., Papa P., Ortenzi R., Zingaretti G., Zema J., Costarelli S.*  
Malattia di Aujeszky: l'ordine di nascita del suinetto come possibile  
elemento di criticita'..... p. 362

*Veronesi G., Nigrelli A.D., Casappa P.*  
Valutazione dell'efficacia della profilassi anticoccidica con toltrazuril  
(Cevazuril® 50mg/ml) in condizioni di bassa pressione infettiva da  
*Isospora suis* in un allevamento suinicolo industriale..... p. 370

## 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.



Controllo avanzato di  
*Mycoplasma hyopneumoniae*

# Protezione adeguata allo svezzamento



PROTEZIONE TEMPESTIVA CONTRO IL MYCOPLASMA

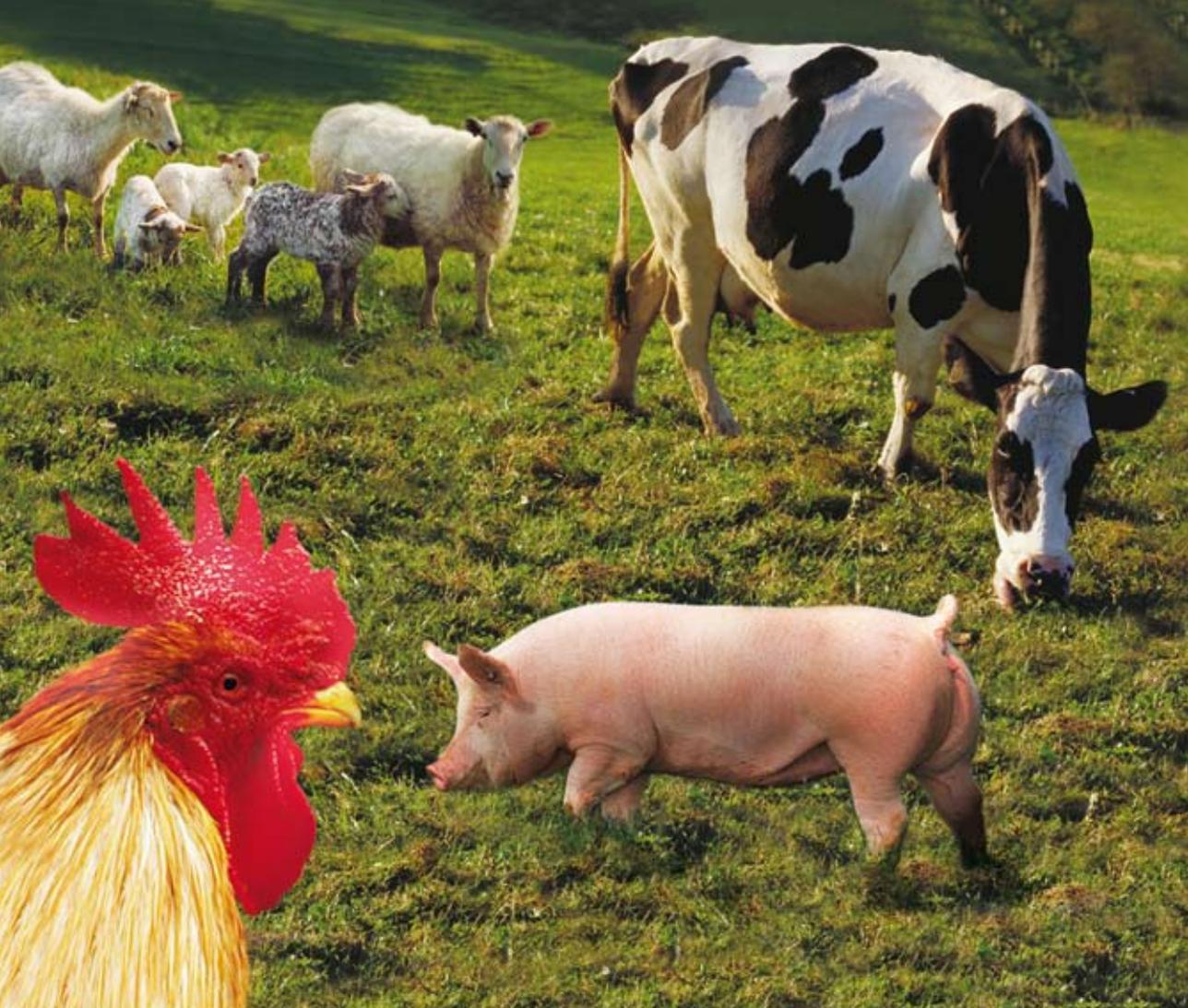
Chiedi al tuo Veterinario informazioni sull'unico vaccino in grado di garantire:

- Protezione fino a quando serve: dallo svezzamento per almeno 24 settimane
- L'immunità più veloce per un vaccino monodose
- La vaccinazione più precoce dalla prima settimana

Elanco Animal Health  
Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.  
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)  
Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068  
[www.elanco.com](http://www.elanco.com)

**Elanco**

Soluzioni fidate.



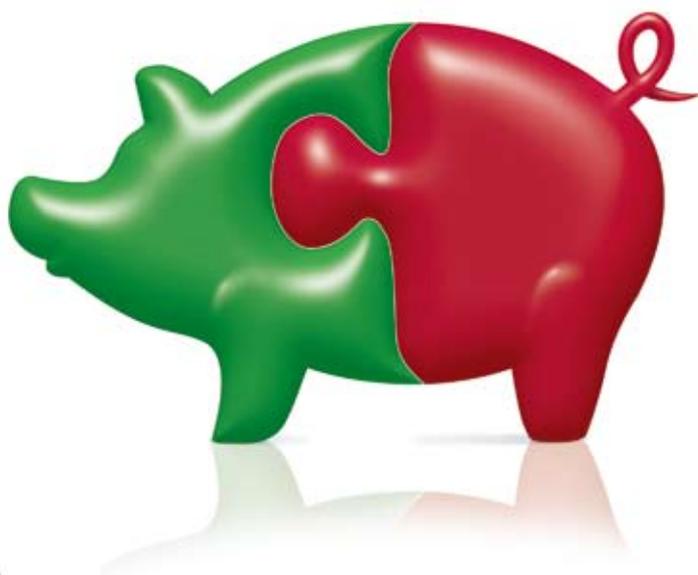
**La soluzione giusta  
per ogni **specie**  
di problema**

[www.vetclub.it](http://www.vetclub.it)



Bayer HealthCare  
Animal Health





Efficacia senza compromessi

# CircoVIRUS

- ✓ il vaccino più venduto nel mondo
- ✓ miscelabile con il vaccino **Myco**



Chiedi al tuo veterinario



**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**

Insieme, oltre la salute animale



the world  
of chemifarma



**chemifarma** S.p.A.  
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Il tuo partner in terapia  
veterinaria e nutrizione



Terapia  
Veterinaria



Nutrizione  
Animale



Linea  
Disinfettanti

www.chemifarma.it

Distributore esclusivo per l'Italia:

**DOPHARMA**  
INTER NATIONAL  
VETERINARY PHARMACEUTICALS

**MAYMO**

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](http://www.chemifarma.it)



# 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



Innovazione e Ricerca  
al servizio della produzione animale

-  Satisfazioni per i professionisti
-  Benessere per gli animali
-  Rispetto per l'ambiente



## PREFAZIONE

E' con vero piacere che ottempero alla richiesta del Presidente della Società Prof. Paolo Martelli di scrivere, in qualità di Consigliere Decano, questa presentazione del 37° Meeting Annuale.

Il volume che tenete in mano, al solito, rappresenta il segno tangibile della vivacità e della vitalità della nostra Società Scientifica, ovviamente mediate dall'impegno, dalla professionalità e dalla passione di Voi Soci.

Viviamo in tempi procellosi, nei quali ciò che appariva certo e consolidato ieri improvvisamente si scopre non esserlo più oggi: la nostra stessa attività, in fondo così direttamente legata alla terra ed ai suoi ritmi, oggi è scossa nelle sue fondamenta, trovandosi inserita in un contesto non più e non solo tipicamente agroalimentare, quanto piuttosto compenetrato anche da tematiche, ad esempio, energetiche o ambientali. Il famoso traguardo 20/20/20 della Comunità Europea varato nel 2008 e ribadito nel 2010 nel Documento "Strategia Europa 2020", in sostanza prevede di adottare una politica integrata in materia di energia e cambiamenti climatici, che fissa obiettivi ambiziosi per il 2020. Lo scopo è indirizzare l'Europa sulla "giusta" strada verso un futuro sostenibile sviluppando un'economia a basse emissioni di CO<sub>2</sub> improntata all'efficienza energetica. Sono previste le seguenti misure da raggiungere entro il 2020:

- ridurre i gas ad effetto serra del 20%
- ridurre i consumi energetici del 20% attraverso un aumento dell'efficienza energetica
- soddisfare il 20% del nostro fabbisogno energetico mediante l'utilizzo delle energie rinnovabili

Cosa questo abbia contribuito a significare nell'economia delle nostre aziende, con l'impatto del terzo punto sui costi delle materie prime e sul paesaggio delle nostre campagne, è materia così semplice da non richiedere ulteriori commenti, se non che siamo per certi versi "obbligati" a non occuparci solo più della zoppina della scrofa. E' ciò che la SIPAS ha fatto in questi anni, coniugando l'impegno tradizionale della Società Scientifica nella divulgazione e nel trasferimento della conoscenza tecnica con questi temi di carattere più generale. Tutto ciò è parte di una "moderna cultura del maiale", alla quale tutti noi che del suino in qualche modo viviamo siamo tenuti ad afferire.

A questo proposito, per uscire dalla nuvole buie e un po' trite in cui ci siamo messi, provvedo ad indicarvi alcuni libri di piacevolissima lettura, attinenti anch'essi alla moderna "cultura del maiale".

In primo luogo è davvero di alta qualità la trilogia di Pimain, il guaritore di maiali ("Il guaritore di Maiali" del 2007, "Il mistero degli incurabili" del 2008 e "L'uccisore di seta" del 2009).

L'Autore è Lorenzo Beccati, tutti i volumi sono usciti per Kowalski: si tratta di thriller storici ambientati nella Genova di fine '500, il cui protagonista, Pimain, è una figura particolare di "guaritore di maiali" la cui connotazione protoveterinaria è, in realtà, alquanto labile.

I maiali rappresentano per lui ciò che gli umani spesso gli negano: fedeltà, abnegazione, schiettezza.

Per questo comunica con loro, e cura le loro malattie: in modi per lo meno bizzarri (memorabile una sverminazione di gruppo nel primo volume), tuttavia per noi - autentici guaritori di maiali con certificazione dello Stato - è un ulteriore piacere, parallelo a quello della lettura e dello svolgersi della trama sempre appassionante, aggiungere questa analisi zootecnica e veterinaria delle pagine di Lorenzo Beccati.

Il secondo libro che voglio segnalarvi ha un titolo non entusiasmante ma un eccellente contenuto: si tratta di “Porco Killer” uscito per Morganti nel 2007, ultimo libro della serie “Cattivi golosi”.

E’ una raccolta di racconti gialli tutti di ambito norcino, alcuni dei quali davvero di buona qualità, realizzando un riuscito “mix” di umorismo ed avventura. In ogni caso il suino (in questo caso più sotto le fattezze dei vari prodotti trasformati che come soggetto animato) è sempre ben presente in ogni racconto.

L’ultima segnalazione che voglio darvi riguarda un libro che non ho ancora finito, si tratta di “Angeli e salami” stampato sempre per Morganti nel 2009.

L’Autore, sotto pseudonimo, è P.G. Brown, ma è assai probabile, data anche la comunanza di Casa editrice, che sia uno degli Autori della raccolta “Porco Killer”.

E’ dunque una gustosissima parodia di “Angeli e demoni” di Dan Brown, di svelta e semplice lettura. La setta segreta dei vegetariani fondata nel 1407 dall’astronomo Luigi Finocchio di Aragona da sempre in lotta contro il consumo di carni suine, il mitico Centro di Ricerche CREMOSINI, Centro Ricerche Epistemologiche Maiali Ogm, Salami e Insaccati Naturali Italiani, il protagonista Arcibaldo Marcorè esperto in simbologia suina sono alcuni dei compagni di viaggio in questa spesso esilarante lettura, in un agglomerato non sempre facilmente districabile di riferimenti autentici e purissime cialtronerie il cui monitoraggio rappresenta – ancora – un piacere nel piacere per l’appassionato di suinicoltura.

Tornando a Piacenza, anche quest’anno il numero di comunicazioni scientifiche è nella media delle ultime edizioni, segno di una costante attività di approfondimento da parte di una parte non piccola dei soci della SIPAS, che voglio qui ringraziare per l’impegno profuso.

Quest’anno invece il Consiglio Direttivo ha deciso di non assegnare il Premio Guadagnini, per la ragione che si è ritenuto che nessuno dei lavori proposti avesse raggiunto – a seguito di una approfondita e meditata valutazione – quegli standard di innovazione o di profondità culturale che sono richiesti per l’aggiudicazione del premio.

L’anno prossimo vi sarà quindi la possibilità di una doppia attribuzione.

Desidero inoltre, a nome del Consiglio, ringraziare la Industrie di Salute Animale sponsor della SIPAS per il 2011, il cui sostegno protratto nel tempo è allo stesso tempo garanzia di continuità per la Società e testimonianza di reciproca soddisfazione per le attività svolte.

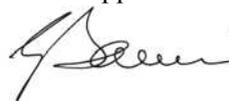
Agli amici Relatori di questo e dei prossimi eventi programmati per il 2011 va la riconoscenza ed il ringraziamento della Società tutta, per la disponibilità mostrata e per la qualità delle informazioni che certamente saranno in grado di proporre.

Agli amici del Consiglio Direttivo, alla Segreteria Delegata ora approdata in MV Congressi, e soprattutto al carissimo Presidente un caloroso ringraziamento, per il mio modesto tramite, da parte di tutta la Società per il prezioso lavoro svolto.

A tutti Voi, cari Soci, l’augurio di un magnifico Meeting 2011 e di una proficua lettura di questo e degli altri volumi di “cultura del maiale” che vi ho segnalato.

Piacenza, 24 Marzo 2011

Il Consigliere Decano  
Giuseppe Baricco



ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

*Bardolino 14 Maggio 2010*



# LA PRODUZIONE SUINICOLA NAZIONALE E POSSIBILI STRATEGIE PER UN SUO VALORE AGGIUNTO

GIANDOMENICO GUSMAROLI

*Presidente Associazione Nazionale Allevatori Suini*

Nel 2009 la produzione suinicola italiana è stata pari a 12.922.000 capi, in calo dello 0,8% rispetto al 2008. Sensibilmente più marcato il calo produttivo registrato nel circuito dei suini destinati alle produzioni a Denominazione di Origine Protetta: secondo i dati diffusi dagli Istituti di controllo IPQ-INEQ, i suini certificati per le DOP sono stati 8.707.362, in calo del 4,5% rispetto all'anno precedente.

Poiché i suini certificati per le DOP rappresentano il 67% circa dell'intera produzione nazionale, si può affermare che nel 2009 si è registrato un consistente abbassamento dei livelli produttivi, fenomeno che nel circuito DOP non si verificava dal 2001.

Per quanto riguarda le importazioni, si ricorda che in Italia l'importazione delle cosce rappresenta il 67% circa dell'import totale carni suine: nel 2009 il numero delle cosce fresche e congelate importate è stato di circa 55 milioni di pezzi, contro i circa 26 milioni di cosce prodotte a livello nazionale. Nel 2009 il volume delle importazioni di carni suine fresche e congelate è leggermente calato, mentre si è registrato un incremento delle importazioni di carni lavorate, con particolare riguardo ai prosciutti crudi (+1,1% rispetto al 2008).

Lo scorso anno, nonostante la grave crisi economica, si è registrato un buon andamento delle esportazioni di carni lavorate (+2,7% rispetto al 2008). Gli aumenti hanno riguardato in particolare i prosciutti crudi disossati e lo speck (+3,5%), i prosciutti cotti (+1,8%) e la mortadella ed i wurstel (+10,3%). In calo invece l'export di prosciutti crudi con osso (-13,3%) e di salami e salsicce (-0,9%).

Nel 2009 il consumo di carne suina in Italia è stato di circa 2.247.000 t (equivalente carcassa), in aumento dell'1,5% rispetto al 2008: il dato include tutti gli acquisti, cioè quelli realizzati dalle famiglie, dalla ristorazione e dall'industria di trasformazione delle carni.

La percentuale di autoapprovvigionamento lo scorso anno è scesa al 68,9%, in calo dello 0,8% rispetto al 2008. Tuttavia, mentre il grado di autoapprovvigionamento per le cosce è pari al 35%, il grado di autoapprovvigionamento per i lombi è del 90%.

Pertanto, mentre per le cosce suine l'Italia è dipendente dalle importazioni, per la carne suina fresca è quasi autosufficiente.

La crisi economica ha inciso sul valore della produzione suinicola nazionale che nel 2009 è stato di circa 2.361,573 milioni di €, in calo del 6,8% rispetto al 2008. Sul mercato di Modena, il prezzo medio 2009 del suino pesante da 156/176 kg/p.v. è stato di 1,219 €, in calo del 7,1% rispetto al 2008: dopo un inizio d'anno in cui le quotazioni sono state costantemente orientate al ribasso, il mercato del suino pesante ha avuto un andamento più sostenuto a partire dal mese di agosto ed il suo prezzo si è collocato al di sopra dell'andamento dei prezzi dei suini leggeri rilevati sul mercato olandese e spagnolo fino al mese di febbraio 2010.

Ma questo non è bastato a risollevarne la situazione finanziaria dei suinicoltori che continuano a sostenere costi di produzione elevati: nel 2009 il costo di produzione di un suino pesante in un allevamento a ciclo chiuso è stato 1,3 €/kg, contro un prezzo medio del suino pesante di 1,219 €/kg.

I suinicoltori italiani pertanto non riescono a far quadrare i conti aziendali perché i costi di

produzione si mantengono in media più elevati rispetto al prezzo del suino da 156/176 kg/p.v. e superano di circa il 20% la media europea.

Secondo i dati diffusi dalla Direzione Generale Agricoltura della Commissione Europea, nel 2009 in Italia il costo al quintale del mangime è stato di 25,51€, contro un media europea di 21,72 €: in Spagna il costo è stato di 23,01 €, in Olanda di 21,29 €, in Germania di 19,07 € e in Francia di 18,15 €.

Le difficoltà finanziarie dei suinicoltori sono aggravate da un'iniqua distribuzione del valore aggiunto lungo la filiera del suino pesante. Oggi, la Grande Distribuzione Organizzata trattiene circa il 50% del valore finale di un prodotto e dal 2004 al 2009 il suo margine di guadagno è aumentato di 4,7 punti percentuali. Al contrario, il valore attribuito agli allevatori nel 2009 è stato pari al 15,9% del valore finale del prodotto e dal 2004 al 2009 il margine di guadagno è sceso di 1,4 punti percentuali.

La crisi del settore suinicolo sta determinando profondi cambiamenti strutturali nel sistema allevatorio. Si assiste ad un fenomeno di progressiva concentrazione della produzione: in Italia il 4,2% delle aziende suinicole alleva il 95,3% dei capi presenti sul territorio e ciò si deve alla maggiore capacità finanziaria delle grandi aziende di far fronte alle difficoltà legate alla difficile situazione di mercato o alla necessità di adeguarsi a cambiamenti normativi che implicano nuovi costi.

Nel circuito DOP la crisi ha determinato un calo del numero degli allevamenti aderenti (-3% nel 2008 rispetto al 2007) e un calo del numero delle scrofaie (-5% nel 2008).

La crisi ha coinvolto anche il segmento della trasformazione: nel 2009 la riduzione delle salature DOP (-6,27% rispetto al 2008) è stata superiore alla riduzione dell'offerta di suini certificati. (-4,52% rispetto al 2008).

In sostanza, riassumendo in un quadro più sintetico la situazione economica appena descritta, per la suinicoltura italiana lo scenario oggi è il seguente:

1. costi di produzione in media superiori al prezzo medio del suino pesante e decisamente superiori alla media europea;
2. iniqua distribuzione del valore aggiunto lungo la filiera e consolidamento della posizione dominante della Grande Distribuzione Organizzata;
3. squilibrio tra offerta e domanda di suini certificati per DOP, con un esubero di un quarto delle cosce disponibili, un aumento delle cosce avviate ad altre destinazioni e un netto calo delle salature;
4. difficoltà nell'individuare una valida strategia per la commercializzazione e valorizzazione dei tagli diversi dalle cosce del suino pesante;
5. assenza dell'obbligo di indicare sull'etichetta del prodotto trasformato in Italia il luogo di origine della carne suina utilizzata.

Le criticità evidenziate dimostrano che per garantire il reddito degli allevatori è necessario attuare politiche di governo dell'offerta nel circuito DOP, rafforzare le caratteristiche distintive delle nostre produzioni e perseguire una più equa distribuzione del valore aggiunto lungo la filiera.

Tutte le iniziative interprofessionali finora intraprese si inquadrano in questa direzione.

Tra esse è opportuno citare il Piano degli impegni esecutivi per il settore suinicolo del 21

luglio 2008 e l'Addendum al Piano siglato l'8 luglio 2009.

L'accordo stipulato tra allevatori e macellatori include una serie di impegni a breve termine tra cui la costituzione delle Commissioni Uniche Nazionali per suini e derivati, la formulazione di un contratto tipo, lo sviluppo di un modello condiviso di valutazione carcase, la valorizzazione delle carni del suino pesante, la programmazione dell'offerta per le produzioni DOP, la predisposizione di un piano produttivo dei suini leggeri ed il superamento delle emergenze sanitarie, come quelle determinate dalla presenza sul territorio della Malattia Vescicolare Suina.

Importanti anche l'iniziativa legislativa del Governo sull'etichettatura dei prodotti alimentari ed un nuovo orientamento normativo sul ruolo dei Consorzi di Tutela.

Il recente D. Lgs. 8 aprile 2010 n. 61 sulla tutela delle denominazioni di origine e le indicazioni geografiche dei vini attribuisce un nuovo ruolo di governo dell'offerta ai consorzi di tutela che possono definire "l'attuazione delle politiche di governo dell'offerta, al fine di salvaguardare e tutelare la qualità del prodotto DOP e IGP e contribuire ad un miglior coordinamento dell'immissione sul mercato della denominazione tutelata, nonché definire piani di miglioramento della qualità del prodotto". Si tratta di un principio generale la cui applicazione potrebbe essere estesa anche ad altre DOP e IGP.

Per superare il difficile momento di crisi, è indispensabile anche l'adozione di strategie produttive per l'allevamento suinicolo italiano.

Due le alternative possibili: realizzare un prodotto indifferenziato, ossia allevare suini privi di una specifica caratterizzazione, ricercando unicamente la riduzione dei costi, oppure realizzare un prodotto differenziato, cioè selezionare ed impiegare suini le cui cosce e carni siano qualitativamente più adatte alle trasformazioni DOP.

La scelta di realizzare un prodotto indifferenziato comporta le seguenti conseguenze:

1. il prodotto italiano diventa sostituibile con il prodotto estero;
2. si affida totalmente alla macellazione la cernita delle cosce accettabili per la trasformazione (anche per il circuito DOP) con il rischio che la selezione avvenga in base a criteri arbitrari;
3. si sacrificano sia la qualità della produzione suinicola, sia le produzioni tipiche di qualità;
4. si concentrano nel breve periodo gli eventuali benefici economici.

La scelta di realizzare un prodotto differenziato, con precise connotazioni distintive invece consente di:

1. proteggere il prodotto italiano dalla concorrenza di quello estero;
2. evitare che la scelta delle cosce dal avviare alla trasformazione avvenga in base a criteri arbitrari;
3. valorizzare la produzione suinicola e le produzioni tipiche italiane;
4. fare una scelta di qualità destinata a produrre effetti nel lungo periodo.

In un periodo di crisi economica, la scelta di proporre al mercato un prodotto qualitativamente meno pregiato ha un orizzonte di breve periodo, invece, investire nella qualità della produzione legata al territorio significa porre le fondamenta per il futuro dell'intera filiera suinicola italiana.

Per questo, la selezione del Libro genealogico gestito dall'ANAS punta alla produzione di carni idonee alla trasformazione di qualità per rafforzare la connotazione distintiva del

prodotto interamente “Made in Italy”. Per questo, la genetica italiana ANAS è il riferimento dei Disciplinari di produzione dei prodotti a Denominazione di Origine Protetta.

Pertanto, la scelta di selezionare e produrre per ottenere carni suine qualitativamente differenziate fa parte di una strategia di filiera. Questa scelta deve essere condivisa e supportata da tutti gli anelli del ciclo produttivo poiché la tenuta del sistema non può prescindere da un’equa remunerazione dell’impegno dei suinicoltori italiani.

In conclusione si deve purtroppo prendere atto della sussistenza di uno squilibrio di forze tra la Grande Distribuzione Organizzata e il resto degli operatori della filiera, che marginalizza il ruolo economico dell’allevamento, e si devono denunciare i comportamenti dell’industria di macellazione non rispettosi degli accordi sottoscritti con gli allevatori nella sede istituzionale del Ministero agricolo.

Pertanto si ritiene che il mondo agricolo non possa rimanere inerme e continuare a subire le strategie vessatorie di altri. Serve un rinnovato protagonismo per affrontare la sfida di una valorizzazione della produzione suinicola italiana, che abbia come perno l’allevamento. A questo proposito è interessante riportare quanto deliberato dai soci ANAS già in occasione dell’assemblea del 10 dicembre 2009: *“in mancanza delle condizioni per una leale cooperazione con gli altri soggetti della filiera, gli allevatori debbono prendere seriamente in considerazione di assumere iniziative nuove per la valorizzazione delle produzioni, quali l’utilizzo di denominazioni e marchi gestiti direttamente dal sistema degli allevatori”*. Si tratta di una posizione esplicita, che già indica una strategia. Nel rispetto di questa delibera, ANAS ha attivato una progettualità per offrire rinnovati e più consoni modelli operativi per i suinicoltori italiani.

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**LA DIAGNOSI DI LABORATORIO  
IN MEDICINA SUINA**

*Marmiolo (MN), 8 ottobre 2010*



# LA VALUTAZIONE CRITICA DEI TEST DIAGNOSTICI

STEFANO GUAZZETTI  
[stefano.guazzetti@ausl.re.it](mailto:stefano.guazzetti@ausl.re.it)

La diagnosi è l'atto che meglio riassume ed identifica le capacità del clinico. Nonostante ciò la diagnosi è connessa in modo indissolubile all'errore diagnostico e seppure vi sia in genere un ampio accordo sul fatto che la massima abilità del clinico consista nella capacità di sbagliare meno frequentemente, l'errore diagnostico è percepito e vissuto dal veterinario in modo meno che sereno: questo è infatti considerato il più grave degli errori, in quanto dalla diagnosi discendono tutte le azioni del clinico veterinario, sia in senso terapeutico che preventivo. Si deve anzitutto riconoscere che, al di là di casi banali, non è quasi mai possibile conoscere l'esatta condizione di salute o malattia di un animale in vita, sia per la variabilità delle caratteristiche clinicamente misurabili che connotano per l'appunto lo stato fisiologico o patologico, che per l'imperfezione dei mezzi diagnostici utilizzabili nella pratica clinica.

A ben vedere coesistono nel clinico due attitudini opposte: un rigetto formale dell'errore, in quanto componente indesiderata della diagnosi, ed una attitudine a valutare criticamente ed in modo integrato tutti quegli elementi che compongono il quadro diagnostico, dalla anamnesi all'esame più specialistico. Questa ultima attitudine, già presente nei clinici più giovani è affinata con l'esperienza ed - è possibile dimostrarlo - è riconducibile alla comprensione, seppure intuitiva, dei fondamenti della logica induttiva formulati da Thomas Bayes (1702-1761) nel suo teorema.

Senza volere qui entrare nei dettagli matematici, pur semplici, della teoria di Bayes e volendo mantenere anche in questi atti un approccio discorsivo, si cercherà di fornire al clinico una formalizzazione di questa sua naturale attitudine critica, che risulterà sicuramente utile non fosse altro per tentare di quantificare l'incertezza associata alle conclusioni diagnostiche.

## Bayes e il ragionamento diagnostico

Per meglio comprendere l'origine della incertezza associata ad un test diagnostico si deve considerare in primo luogo la variabilità delle caratteristiche misurabili delle popolazioni, in particolare di quelle di rilevanza clinica. Questa variabilità comprende anche quella componente eventualmente introdotta dall'utilizzo di strumenti di misura. Si osservi il grafico *a* della Fig. 1: qui è rappresentata la distribuzione di una misura di importanza clinica in una ipotetica popolazione di malati e non malati. Le distribuzioni sono completamente separate ed è possibile identificare un valore che con certezza discrimina i soggetti malati dai sani. Questa situazione ideale - il *gold-standard* - non si realizza quasi mai nella pratica, dove invece si ha piuttosto la situazione schematizzata nel grafico *b*: la sovrapposizione delle distribuzioni dei valori della variabile discriminante impedisce di distinguere con certezza e sulla sola base della misurazione della variabile di interesse, i soggetti malati da quelli sani ma viene introdotta dalla applicazione del test stesso la possibilità di commettere un errore diagnostico, identificando come malato un sano o viceversa.

Il quesito fondamentale del clinico è a questo punto: dato un certo esito del test diagnostico, quale è la probabilità che il soggetto sia malato (o sano?). È quindi nella metrica probabilistica che il quesito deve trovare una soluzione e, si vedrà, questa è data dalla regola di Bayes, che mostra come pesare le evidenze fornite dal test diagnostico in modo da ottenere, a partire dalla probabilità pre-test di malattia, la probabilità post-test.

Per ragioni operative definiamo qui la diagnosi come processo, induttivo, dall'esito incerto, che si realizza iterando il seguente schema:

**informazione pre-test → test → informazione post-test.**

In questo senso **un test diagnostico è qualsiasi informazione che modifichi la nostra convinzione (probabilità) sullo stato di malattia di un animale.**

La conoscenza (probabilità) a priori che un soggetto sia malato interagisce quindi con la probabilità probativa (caratteristica del test) per dar luogo alla probabilità a posteriori (post test).

Il teorema di Bayes <sup>1</sup>: fornisce una risposta al problema: **dato che si è verificato A (test positivo o negativo) qual è la probabilità che la sua causa sia B (la malattia)?** In altre parole qual'è la probabilità di malattia dato un test positivo  $P(M+|T+)$ ?

### La Probabilità

Intuitivamente tutti possediamo il concetto di probabilità: per il nostro uso e senza voler indulgere in eccessivi formalismi, la probabilità di un evento può essere definita come il rapporto tra il numero dei casi favorevoli ad un evento di nostro interesse ed il numero dei casi possibili.

$P(x) = \frac{\text{casi favorevoli}}{\text{casi possibili}}$ , ad esempio, la probabilità che esca 4 (o qualsiasi altro numero)

nel lancio di un dado è  $1/6$  e cioè circa 0.167 (il 16.7%).

Alcune delle proprietà delle probabilità risulteranno utili per comprendere quello che segue e vengono qui illustrate:

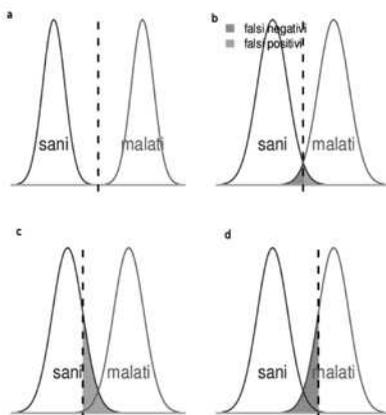
La probabilità è sempre compresa fra 0 ed 1. Se  $P(x)$  è la probabilità che un evento  $x$  si verifichi,  $1-P(x)$  è la probabilità che l'evento  $x$  non si verifichi.

È qualche volta conveniente esprimere la probabilità in termini di *odds*, cioè il rapporto fra i casi favorevoli e i casi sfavorevoli. Ad esempio nel caso del lancio di un dado l'odds di ottenere 4 è

$1/5$ , cioè 0.2. Le relazioni fra probabilità ed odds sono  $\text{odds}(x) = \frac{P(x)}{1-P(x)}$ ;  $P(x) = \frac{\text{odds}(x)}{1+\text{odds}(x)}$

Inoltre, se due eventi sono indipendenti, la probabilità di osservare entrambi è il prodotto delle probabilità di osservare i singoli eventi.  $P(A \cap B) = P(A) \times P(B)$

Fig. 1.



1 Il teorema di Bayes afferma che, date  $H_1, H_2, \dots, H_1, \dots, H_k$  cause tra loro esaustive e incompatibili e un evento  $E$ , la probabilità che avendo osservato l'evento, sia  $H_i$  la causa che lo ha generato è data da:

$$P(H_i | E) = \frac{P(E | H_i) P(H_i)}{\sum_{i=1}^k P(E | H_i) P(H_i)}$$

Il concetto di probabilità permea ogni aspetto del processo diagnostico ed epidemiologico, laboratoristi e clinici hanno la loro particolare visione degli aspetti probabilistici legati alla diagnosi.

**La probabilità pre-test** (a priori) è la probabilità di un soggetto di essere malato prima di essere assoggettato ad un test. La più semplice interpretazione della probabilità pre-test è quella degli epidemiologi, per i quali questa è semplicemente la probabilità che un soggetto estratto casualmente da una popolazione sia malato o abbia una condizione

di interesse  $P(M_{pre}^+) = \frac{\text{n di malati}}{\text{popolazione}}$  e si identifica quindi con la *prevalenza* della

condizione nella popolazione.

Il clinico tende ad attribuire a questa quantità una interpretazione individuale, corrispondente al grado di fiducia che egli ripone al riguardo del particolare stato dell'animale (sano o malato), non esistendo - se non in astratto - una situazione di assoluta ignoranza sullo stato clinico dell'animale, non fosse altro che in genere egli viene chiamato all'osservazione proprio perché un problema clinico sussiste. Anche quando questo non sia, come ad esempio nella pratica della prevenzione, la probabilità pre-test è sempre valutata relativamente all'età, al sesso, alle caratteristiche di allevamento, e cioè a tutti quei fattori che possono modificare la probabilità di malattia in una popolazione. Questi fattori concorrono alla ponderazione che il clinico effettua sull'esito del test diagnostico applicato.

### **La probabilità probativa: sensibilità e specificità dei test e il rapporto di verosimiglianza.**

Osserviamo di nuovo la figura 1: i pannelli c e d mostrano come variando la posizione del valore soglia che distingue i malati dai non malati, possiamo aumentare o diminuire la proporzione dei falsi negativi e dei falsi positivi. Sensibilità e specificità sono caratteristiche proprie dei test diagnostici e, almeno idealmente, non dipendono dalle caratteristiche del soggetto sul quale il test viene applicato.

La *sensibilità* può essere definita come misura della capacità di un test di identificare correttamente i malati ed è quindi la proporzione di malati che risulta positiva al test. In termini probabilistici la sensibilità rappresenta la probabilità di avere un test positivo, data

la malattia:  $Se = P(T^+ | M^+)$ ,  $Se = \frac{\text{veri positivi}}{\text{veri positivi} + \text{falsi negativi}}$  e il suo

complemento,  $1-Se$ , è la proporzione (probabilità) di falsi negativi.

Il pannello c della Fig. 1 mostra, per un test imperfetto, una situazione di massima sensibilità. Si noti come questa massima sensibilità comporti inevitabilmente una certa quota di falsi positivi.

In modo analogo la *specificità* può essere definita come la misura della capacità di un test di identificare correttamente i non malati ed è cioè la proporzione di non malati che risulta negativa al test. In termini probabilistici la Specificità è la probabilità di avere un test negativo, data la

condizione di non malattia:  $Sp = P(T^- | M^-)$ ,  $Sp = \frac{\text{veri negativi}}{\text{veri negativi} + \text{falsi positivi}}$

e il suo complemento,  $1-Sp$ , è la proporzione di falsi positivi.

Una situazione di massima specificità di un test imperfetto è mostrata nel pannello d della

figura 1, e ben si vede come ciò comporti una certa quota di falsi negativi.

**In ragione di quanto detto può essere utile ricordare, nella pratica clinica, che per escludere la malattia serve un test di grande sensibilità; in quanto un risultato negativo sarà poco probabile in un soggetto malato. Se viceversa l'interesse è rivolto alla conferma di una condizione patologica servirà un: test di grande specificità, di modo che un risultato positivo sia poco verosimile in assenza di malattia.**

Una quantità utile al clinico per poter valutare correttamente l'esito di un certo test diagnostico e che riassume le caratteristiche del test diagnostico è il *rapporto di verosimiglianza* (LR, likelihood ratio): questo ci dice quante volte è più probabile un risultato, positivo o negativo, in un soggetto malato rispetto ad un non malato.

Il LR è una funzione di sensibilità e specificità, è espresso in termini di odds e può assumere valori compresi fra 0 ed infinito. In particolare il *rapporto di verosimiglianza per un risultato positivo* LR<sup>+</sup> dice quante volte è più probabile un risultato positivo (T<sup>+</sup>) in un soggetto malato rispetto ad un non malato ed è calcolato come la probabilità di avere un test positivo essendo malato diviso la probabilità di avere un test positivo essendo non malato:

$$LR^- = \frac{P(T^- | M^+)}{P(T^- | M^-)} = \frac{\text{falsi negativi}}{\text{veri negativi}} = \frac{1 - \text{Sensibilità}}{\text{Specificità}}$$

Idealmente un test perfetto ha LR<sup>+</sup> infinita.

Allo stesso modo, il *rapporto di verosimiglianza per un risultato negativo* LR<sup>-</sup> dice quante volte è più probabile un risultato negativo (T) in un soggetto malato rispetto ad un non malato ed è la probabilità di avere un test negativo essendo malato diviso la probabilità di avere un test negativo essendo non malato:

$$LR^+ = \frac{P(T^+ | M^+)}{P(T^+ | M^-)} = \frac{\text{veri positivi}}{\text{falsi positivi}} = \frac{\text{Sensibilità}}{1 - \text{Specificità}}$$

Un test perfetto ha idealmente LR<sup>-</sup> uguale a 0.

Per comprendere cosa comporti l'applicazione di un test imperfetto in un popolazione si considerino i seguenti esempi: Si immagini di utilizzare un test con Se e Sp di 0.9 (90%), in una condizione prevalenza 0.01 (1%), n=1000, utilizzando lo schema di tabella 1.

Test	Malattia presente	Malattia assente
Positivo (T <sup>+</sup> )	VP	FP
Negativo (T <sup>-</sup> )	FN	VN
	M <sup>+</sup>	M <sup>-</sup>

**Tabella 1** VP=Veri Positivi, FP=Falsi Positivi, FN=Falsi Negativi, VN=Veri Negativi. La tabella 2 permette di computare le frequenze attese degli esiti del test diagnostico:

Test	Malattia presente	Malattia assente	totali
T <sup>+</sup>	9	99	108
T <sup>-</sup>	1	891	892
	10	990	1000

**Tabella 2**

La prevalenza apparente: sarà in questo caso  $108/100=0.108$  (10.8%), a cui corrisponde un valore predittivo di un risultato positivo (VPP) (rapporto fra veri positivi e tutti i positivi) di  $9/108=0.0833$  (8.3%) ed un valore predittivo di un risultato negativo (VPN) (rapporto fra veri negativi e tutti i negativi): di  $891/892=0.9988$  (99%).

Sempre a titolo esemplificativo si osservi quanto atteso nella stessa condizione di prevalenza (1%) ma applicando in una popolazione di 1000 soggetti un test con Se e Sp di 0.99 (99%) (Tab. 3):

Test	Malattia presente	Malattia assente	totali
T <sup>+</sup>	10	10	20
T <sup>-</sup>	0	980	980
	10	990	1000

**Tab. 3.**

La prevalenza apparente sarà qui circa  $20/1000=0.02$  (2%) ed il VPP  $10/20=0.5$  (50%), mentre il VPN sarà circa  $980/980=1$  (100%)

Per ultimo si consideri un test con Se e Sp di 0.9 (90%) ed una prevalenza del 10% (Tab. 4)

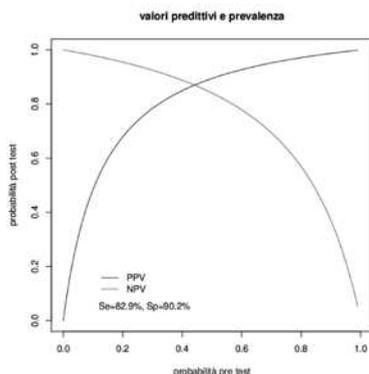
Test	Malattia presente	Malattia assente	totali
T <sup>+</sup>	90	90	180
T <sup>-</sup>	10	810	810
	100	900	1000

**Tab 4.**

Prevalenza apparente:  $180/1000=0.18$  (18%) VPP= $90/180=0.5$  (50%); VPN= $810/820=0.987$  (98.7%)

La Fig. 2 mostra, per un test con sensibilità 82.9% e specificità 90.2%, come i valori predittivi per un risultato negativo o positivo varino in funzione della probabilità pre-test

**Valori predittivi e prevalenza:** gli esempi qui sopra servono a far comprendere quale sia l'importanza della probabilità pre-test nel determinare il valore predittivo di un test. Sensibilità e specificità del test, che pur rivestono grande importanza ( in particolare per i laboratoristi), non sono da sole di grande utilità al clinico, che necessita di integrare la conoscenza di sensibilità e specificità con (la sua stima del) la probabilità a priori per ottenere il valore predittivo del test (cioè la probabilità post-test) che, come abbiamo visto, è la quantità di suo interesse, perché risponde al quesito fondamentale: dato questo risultato, qual'è la probabilità che il soggetto sia ammalato?



**Fig. 2:** rapporto fra valori predittivi e prevalenza.

### La probabilità post-test

Il T. di Bayes può essere riscritta nei termini delle quantità sopra descritte: sensibilità, specificità e probabilità pre-test o, oppure in termini di odds e rapporto di verosimiglianza.

I calcoli, sulla scala di odds, sono molto semplici ed il T. di Bayes può essere scritto in forma semplificata:  $\text{odds post-test} = \text{odds pre test} \times \text{LR}$ , valendo sempre le relazioni

e  $P(x) = \frac{\text{odds}(x)}{1 + \text{odds}(x)}$  e potendo quindi riportare sempre il risultato in termini di probabilità.

Riprendiamo il terzo esempio (Tab. 4) per mostrare come i calcoli siano piuttosto banali: per un test con Se e Sp di 90% ed una prevalenza del 10%, ponendo un test con esito positivo avremo:

$$\text{odds( pre-test)} = \frac{0.1}{0.9} = 0.1\bar{1} \text{ e } \text{LR}^+ = \frac{0.9}{0.1} = 9, \text{ odds (post-test)} = 0.1\bar{1} \times 9 = 1$$

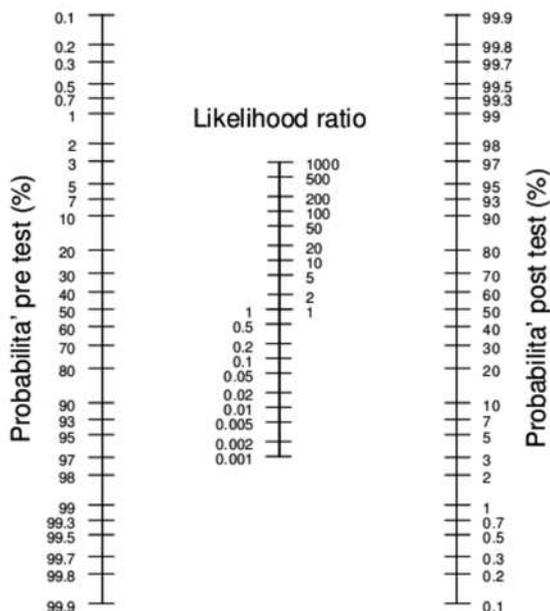
passando dagli odds alle probabilità  $P(\text{post - test}) = \frac{1}{1+1} = 0.5$ : in caso di esito positivo cioè vi è una probabilità del 50% che questo rifletta una condizione di malattia .

Per un risultato negativo, invece, il  $\text{LR}^- = \frac{0.1}{0.9} = 0.1\bar{1}$  e gli odds post test saranno ,

$0.1\bar{1} \times 0.1\bar{1} = 0.01235$  corrispondenti ad una probabilità post-test di  $0.01235/1.01235$  e cioè del 98.8% che è per l'appunto il valore predittivo per un risultato negativo.

La computazione di queste quantità, seppure non presenti alcuna difficoltà e possa essere effettuata anche senza l'uso del calcolatore, può essere ulteriormente semplificata con il ricorso ad uno strumento grafico, come il nomogramma di Fagan. Il suo uso è semplice: con un righello si prolunga un segmento che dall'asse della probabilità pre-test intercetta il valore di LR, per trovare il corrispondente valore di probabilità post-test.

Fig. 3: il nomogramma di Fagan.



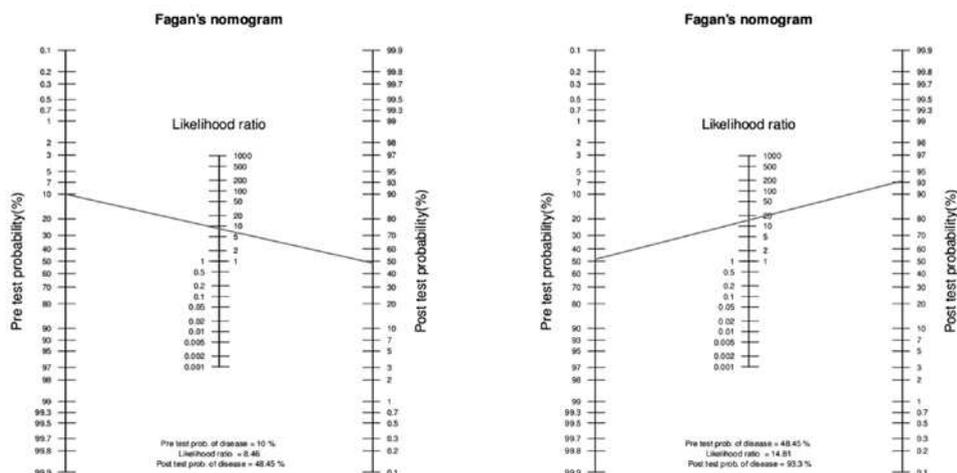
## L'utilizzo di più di un test

Quanto visto fino ad ora si riferisce all'utilizzo di un solo test. Nella realtà il clinico ricorre sempre a più di un test per porre una diagnosi. Seppure nella pratica la distinzione possa risultare meno netta, si riconoscono due strategie di somministrazione di test: in serie o in parallelo.

Se i test vengono somministrati in serie il soggetto è considerato ammalato solo quando è positivo a due (o più) test applicati in modo (con)sequenziale. In questo caso il primo test deve essere il più sensibile (ed economico) ed il secondo test deve essere il più specifico. La probabilità post-test del primo test diventa la probabilità pre-test del secondo test. Ad esempio (Straw et al. Diseases of Swine, IX ed., capitolo 10.) il Modified Agglutination Test (MAT) per *Toxoplasma gondii* ha  $Se=82.9\%$  e  $Sp=90.2\%$  ed il Latex Agglutination Test (LAT) ha  $Se=45.9\%$  e  $Sp=96.9\%$ , la prevalenza attesa, sulla base delle conoscenze del clinico è del 10%.

In caso di MAT negativo la probabilità di malattia (VPN) è del 2% circa (e concludiamo che è poco verosimile la presenza di malattia), concludendo qui gli accertamenti.

In caso di MAT test positivo la probabilità di malattia (VPP) è del 48.5% circa: esito che non possiamo ritenere conclusivo (Fig. 4, pannello sinistro).



**Fig. 4:** Utilizzo sequenziale del test MAT e LAT per *Toxoplasma gondii*.

se anche il LAT risulta positivo la probabilità post-test di malattia sarà del 93.3% circa (Fig. 4, pannello destro).

Nel caso dei test in parallelo due o più test sono somministrati contemporaneamente e il risultato viene ritenuto positivo se almeno uno dei test fornisce esito positivo. Questa strategia è adatta quando entrambi i test hanno scarsa sensibilità, in quanto aumenta la sensibilità ed il valore predittivo di un risultato negativo, mentre diminuiscono specificità e valore predittivo di un risultato positivo.

Si vuole qui accennare al caso, comune nella clinica di allevamento, della interpretazione

di test a livello aggregato, cioè applicati non ad un singolo animale ma ad un campione di una popolazione oggetto di indagine clinica. Si consideri che all'aumentare del numero dei soggetti testati (posto il numero critico di positivi per il quale classificare come ammalato il gruppo di animali ad 1) la specificità cala con il crescere del numero di soggetti esaminati: per  $n=2$  la probabilità di identificare correttamente i soggetti come sani sarà  $Sp^2$ , per  $n=3$  sarà  $Sp^3$  ed in generale la specificità di gruppo (Herd-Specificity) sarà  $HSp = Sp^n$ .

La sensibilità viceversa cresce all'aumentare di  $n$ :  $HSe = 1 - (1 - \text{Prevalenza apparente})^n$ . La prevalenza apparente: è data da  $PA = (Se \times \text{Prevalenza Vera}) + (1 - Sp) \times (1 - \text{Prevalenza Vera})$  dove i due prodotti a destra rappresentano la quota di veri positivi e di falsi positivi.

La prevalenza vera sarà invece 
$$\frac{PA + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

## CONCLUSIONI

Quanto qui trattato vuole solamente essere uno stimolo per il clinico a riconoscere e a fare propri due importanti concetti della epidemiologia clinica, che dovrebbe tenere a mente nella sua pratica.

Il primo e più importante concetto del quale i clinici dovrebbero appropriarsi è che il processo diagnostico è sempre associato alla probabilità di errore diagnostico. I clinici dovrebbero inoltre essere costantemente coscienti del fatto che utilizzano il ragionamento bayesiano nel rivedere in modo iterativo le loro convinzioni a proposito della condizione clinica in esame alla luce degli esiti dei test.

Ciò comporta che i test possano essere interpretati solo alla luce della conoscenza (incertezza) a priori e che non sia in alcun modo possibile delegare ai test diagnostici stessi (in particolare alla diagnostica di laboratorio) la diagnosi, come talora si potrebbe sperare di fare né ad algoritmi che, seppure si debba riconoscere abbiano una qualche valenza didattica, non possono tenere in considerazione la componente probabilistica (cioè la componente di errore) insita nei procedimenti diagnostici.

## BIBLIOGRAFIA

- C J Gill, L Sabin, C H Schmid *Why clinicians are natural bayesians* BMJ Vol 330, 7 may 2005
- Straw et al. *Diseases of Swine*, 9<sup>th</sup> ed., capitolo 10.
- Noordhuizen et al. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*, capitolo IV,4.
- Greiner, M., Gardner, I.A. *Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies*, Preventive Veterinary Medicine 45 (2000), 43-59
- Christensen, J., Gardner, I.A. *Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases*, Preventive Veterinary Medicine 45 (2000), 83-106

# **PRELIEVO, CONSERVAZIONE ED INVIO DEI CAMPIONI PER INDAGINI DI LABORATORIO IN PATOLOGIA SUINA**

## ***SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND PRESERVATION IN SWINE PATHOLOGY***

LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER),  
Sezione di Reggio Emilia*

**Parole chiave:** campioni, prelievo, conservazione, patologia suina

**Key words:** sample, collection, preservation, swine pathology

### **INTRODUZIONE**

Il campionamento costituisce la prima importantissima fase del processo analitico ed è pertanto evidente che, per ottenere risultati attendibili, non si possa prescindere dall'applicazione di corrette pratiche di raccolta dei campioni, che garantiscano l'idoneità del materiale campionato da destinare all'esecuzione di indagini di laboratorio (quantità minima, numero di aliquote, ecc). Sono altrettanto importanti le fasi precedenti il campionamento e quelle di trasporto dopo il prelievo. Per quanto riguarda quest'ultimo punto occorre assicurarsi che dal momento del prelievo a quello della consegna al laboratorio di analisi, il campione sia adeguatamente confezionato, non subisca alterazioni di alcun tipo e sia conservato alla giusta temperatura.

Nel corso dell'esposizione verranno trattati i metodi di prelievo e di conservazione appropriati per l'esecuzione di indagini virologiche (isolamento), batteriologiche, biomolecolari e citostopatologiche. Saranno inoltre trattati gli aspetti concernenti il campionamento di sangue da destinare a prove sierologiche e biochimico-cliniche.

### **CRITERI GENERALI**

Come accennato nell'introduzione, possiamo suddividere le fasi che precedono l'arrivo del campione al laboratorio di analisi in tre punti fondamentali:

1. Fase precedente il prelievo
2. Il prelievo
3. Invio dei campioni prelevati al laboratorio.

#### ***Fase precedente il prelievo***

In questa fase risulta di particolare importanza l'inquadramento della problematica sanitaria presente in allevamento, che indirizzerà verso la scelta più appropriata degli animali da campionare, del tipo di prelievo e delle modalità di invio al laboratorio. In questa fase può essere di grande aiuto consultare il laboratorio, assicurandosi che le operazioni sopraccitate siano adeguate per le ricerche che si vogliono effettuare. In questo contesto, ad esempio, nel caso sia presente una patologia respiratoria in allevamento, la scelta degli animali da campionare dovrà ricadere su soggetti rappresentativi della problematica, che presentano la forma acuta della malattia, possibilmente non sottoposti a trattamenti antibiotici e correttamente identificati.

#### ***Il prelievo***

Nella pratica quotidiana il prelievo di materiale patologico da inviare al laboratorio avviene, nella maggior parte dei casi, contestualmente all'esame necroscopico, che riveste un ruolo

fondamentale nell'indirizzare il patologo verso la scelta di appropriate indagini di laboratorio. Indipendentemente dal fatto che la necropsia venga eseguita in campo (per il successivo conferimento di visceri patologici al laboratorio) o che l'intera carcassa di animali morti o sacrificati sia inviata al laboratorio, è necessario considerare alcune norme fondamentali che differiscono a seconda del tipo di esame che si vuole affrontare.

#### *Esame batteriologico*

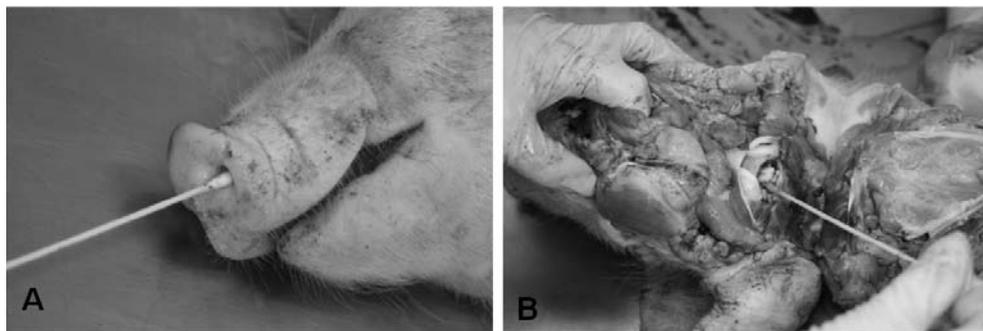
L'esame batteriologico viene eseguito partendo da tessuti patologici (polmone, intestino, rene, milza ecc.), da secreti e da escreti (feci e urine). Indipendentemente dalla matrice da campionare il prelievo per esame batteriologico deve soddisfare i seguenti criteri:

- eseguire il prelievo del materiale patologico prima dell'inizio della terapia antibiotica
- prelievo di materiale patologico in buono stato di conservazione
- invio appropriato di campioni in relazione al sospetto clinico/anatomopatologico
- indipendentemente dal sospetto clinico/anatomopatologico, in caso di campionamento durante l'esame necroscopico, includere sempre l'invio di milza e reni
- preferibilmente organi in toto, piuttosto che porzioni di questi
- evitare l'invio di visceri con lesioni croniche
- invio di materiale patologico accompagnato da accurata anamnesi

Gli escreti patologici (feci e urine) ed i secreti, possono essere campionati con l'utilizzo del tampone. In questo modo è possibile raccogliere campioni da diversi distretti, come ad esempio dalle diverse superfici mucose di numerosi apparati (tamponi nasali, rettali, vaginali, uterini, congiuntivali, ecc.) o dalle sierose (pleura, peritoneo, pericardio) (Fig.1).

**Figura 1.** *Impiego del tampone nell'esecuzione di prelievi per l'esame batteriologico.*

**Figure 1.** *Collection of samples for the bacteriological examination.*



#### *Indagini virologiche*

La ricerca di agenti patogeni virali può essere attuata con l'impiego di diverse metodiche, tra le quali, quelle biomolecolari sono le più attuali e sicuramente le più impiegate. In modo particolare, la metodica PCR, nelle sue diverse applicazioni, per rapidità di esecuzione, costi contenuti, elevata sensibilità e specificità e per la possibilità di testare diversi campioni in un unico pool, trova largo impiego in patologia suina. I criteri da seguire nel campionamento per l'esecuzione di indagini virologiche, non differisce sostanzialmente da quanto già accennato per l'esame batteriologico. Indicazioni specifiche verranno trattate nella parte relativa alla patologia enterica, respiratoria e riproduttiva.

#### *Indagini parassitologiche*

L'esame parassitologico, in diagnostica suina, è praticamente confinato ad indagini su materiale fecale. In questo contesto è consigliabile il prelievo di feci fresche,

preferibilmente dall'ampolla rettale. Se il prelievo viene fatto sul pavimento del box, bisogna avere cura di prelevare le feci appena emesse, campionando esclusivamente la porzione superficiale. La quantità minima deve essere di 3-5 grammi, anche se sono consigliabili quantità non inferiori a 10 grammi, ripetendo il prelievo di feci a distanza di alcuni giorni per aumentare la sensibilità diagnostica dell'esame.

#### *Esame istopatologico*

Il prelievo di campioni tissutali da destinare ad indagini istopatologiche necessita di alcuni importanti accorgimenti:

- il materiale patologico deve essere in ottimo stato di conservazione (tessuti che presentano anche solo iniziali fenomeni autolitici possono evidenziare alterazioni microscopiche che rendono non idoneo il campione).
- il campionamento deve essere rappresentativo della lesione. Sono consigliati frammenti di 1-2 cm<sup>2</sup> di 5 cm di spessore.
- Sebbene esistano numerosi fissativi in commercio, quello più utilizzato è la formalina tamponata al 10%.
- il volume di formalina da utilizzare deve essere 10 volte quella del materiale da analizzare.

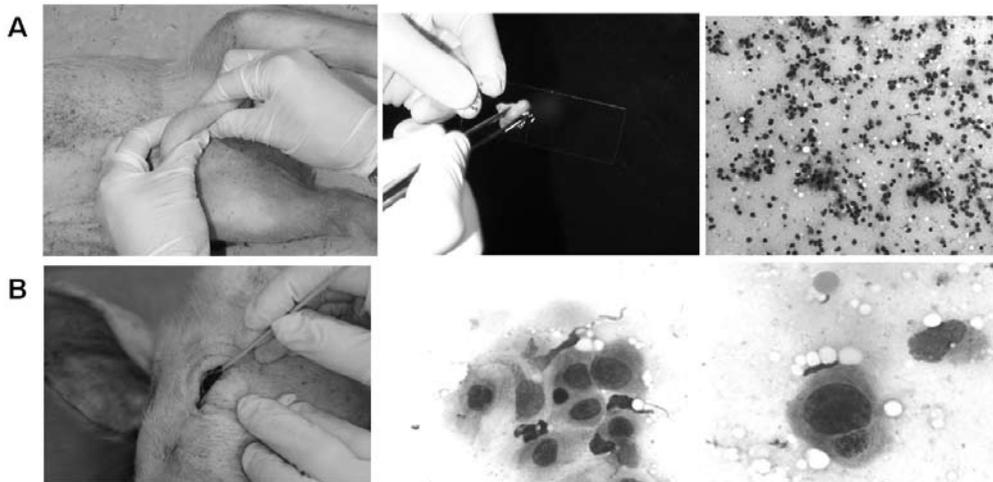
#### *Esame citologico*

Sebbene l'esame citologico trovi attualmente larga applicazione soprattutto nel settore degli animali da compagnia, potrebbe costituire anche in patologia suina un importante ausilio per il patologo. L'esame citologico è infatti rapido, economico e di facile allestimento. L'esame citologico può essere eseguito previo campionamento di organi parenchimosi (ad es. fegato), organi linfatici (ad es. linfonodi e milza) e di liquidi (urina, trasudati, essudati). Esistono pertanto diverse tecniche di allestimento dei preparati citologici: per apposizione, con l'impiego del tampone, per scarificazione e attraverso agoaspirazione.

La tecnica di apposizione, probabilmente quella che trova maggior impiego in patologia suina, consiste nell'appoggiare la superficie del tessuto da campionare sul vetrino. In tal modo il tessuto, preventivamente asciugato su carta, cede sul vetrino un numero variabile di cellule, che possono essere valutate previa colorazione in base alla loro morfologia. I tessuti linfoidei (milza e linfonodi) e diversi parenchimi (renale, epatico, polmonare) possono essere facilmente valutati applicando la tecnica dell'apposizione. Questa metodica può essere impiegata con successo anche durante o subito dopo l'esame necroscopico (Fig. 2). L'uso del tampone è indicato quando non è possibile eseguire il campionamento impiegando le altre metodiche elencate precedentemente. L'impiego del tampone trova pertanto applicazione nel campionamento di superfici mucose (congiuntivale, nasale, vaginale ecc.) o delle sierose.

**Figura 2:** *A. Preparato per impronta da linfonodo inguinale di suino. Citologicamente si osserva la presenza di numerose cellule macrofagico-istiocitarie compatibili con una diagnosi di PMWS (May-Grunwald-Giemsa, 20X). B. Tampone congiuntivale nel suino. Nelle due immagini tratte dai preparati citologici (May-Grunwald-Giemsa, 60X e 100X rispettivamente) si osservano cellule squamose congiuntivali con corpo iniziale di Chlamydia suis.*

**Figure 2:** *A. Swine inguinal lymph-node imprint slide. Cytological examination shown macrofagic hystiocitic cells compatible with a PMWS diagnosis (May-Grunwald-Giemsa, 20X). B. Swine conjunctival smear. Chlamydia suis initial body in the cytoplasm of a conjunctival squamous epithelial cell (May-Grunwald-Giemsa, 60X and 100X respectively).*



La tecnica per scarificazione è indicata soprattutto quando il tessuto da campionare cede poche cellule e viene applicata per lo più su lesioni cutanee e nell'animale in vita. Allo stesso modo l'applicazione dell'agoaspirazione, impiegando aghi di 21-25G e siringhe da 3 a 20 ml, viene prevalentemente eseguita su neoformazioni, per lo più di tipo cutaneo.

#### *Indagini sierologiche*

I campioni di sangue prelevati per indagini sierologiche devono essere qualitativamente e quantitativamente idonei. La quantità di sangue da prelevare deve essere adeguata al numero di prove che si intendono richiedere.

Esistono alcune semplici norme che permettono di ottenere un buon campione di siero:

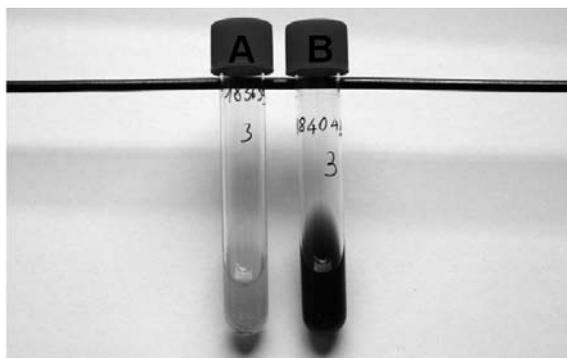
- utilizzare preferibilmente provette in vetro, in ogni caso senza anticoagulante (tappo rosso)
- dopo il prelievo conservare il sangue a +4°C e consegnarlo al laboratorio entro 24 ore
- nel caso non fosse possibile consegnare il campione con i tempi sopraccitati, attendere la formazione del coagulo e centrifugare a 1500 g per 10 minuti per separare il siero
- trasferire il siero ottenuto in una seconda provetta e congelare a -20°C

Per la valutazione dell'avvenuta sieroconversione è necessario recapitare un secondo prelievo, 2-3 settimane dopo il primo. In tal modo sarà possibile evidenziare l'eventuale incremento anticorpale nei confronti di un determinato patogeno, tra il campione prelevato all'esordio dell'infezione (acuto) e quello in fase di convalescenza (convalescente). Nel caso del doppio prelievo, realizzato con le modalità sopraccitate, è consigliabile eseguire gli esami in un'unica sessione, quindi dopo la consegna del secondo prelievo.

La maggior parte dei conferimenti non conformi sono costituiti da sieri emolitici, campioni consegnati in provette contenenti sostanze anticoagulanti (eparina o acido etilendiaminotetracetico - EDTA), campioni congelati in presenza del coagulo, siero insufficiente in relazione alle prove richieste e conferimenti di cui mancano i dati anamnestici (Fig.3).

**Figura 3:** A. Campione di siero idoneo; B. Campione di siero molitico ed inidoneo per l'esecuzione di indagini di laboratorio.

**Figure 3:** Suitable (A) and unsuitable (B) sera for laboratory investigations.



#### *Esami chimico-clinici*

I campioni devono essere raccolti in provette contenenti litio-eparina. La quantità minima di sangue da prelevare, per ottenere un'idonea quantità di plasma su cui eseguire le determinazioni, è di 5 ml. I parametri chimico-clinici comprendono esami atti a valutare il bilancio idrico, elettrolitico e minerale ed i profili muscolare, renale ed epatico.

Cause biologiche, chimiche, fisiche e meccaniche possono determinare l'emolisi del campione. E' importante evitare l'invio di campioni emolitici, in quanto l'emolisi può causare errori di tipo analitico.

#### *Parametri ematologici*

I principali parametri ematologici comprendono l'ematocrito, l'emoglobina, l'esame emocromocitometrico e la formula leucocitaria. Per questo tipo di indagine la quantità minima di sangue da prelevare è di 3 ml, utilizzando provette contenenti EDTA.

#### **Conservazione ed invio dei campioni al laboratorio**

I campioni conferiti al laboratorio devono essere accompagnati da un documento in cui deve essere riportato, oltre alle notizie anagrafiche, un'anamnesi accurata, che comprenda anche il sospetto diagnostico, eventuali terapie in corso e la richiesta relativa alle indagini da eseguire.

In termini generali i campioni destinati all'esecuzione di indagini batteriologiche possono essere consegnati freschi (subito dopo il prelievo) o conservati a temperatura di refrigerazione (+4°C) fino al conferimento al laboratorio per l'esecuzione delle appropriate indagini. Nel caso dell'utilizzo di tamponi occorre evitare l'essiccamento di questi dopo il prelievo. E' pertanto consigliabile il conferimento in terreno di trasporto (nel quale deve essere assente Carbonio, Azoto e agenti di crescita per evitare la replicazione di batteri inquinanti) o in provette contenenti 2 ml di soluzione fisiologica. Il conferimento di tamponi senza terreno o liquido di trasporto è accettabile entro 30 minuti dal prelievo. E' preferibile non sottoporre a congelamento i campioni destinati ad indagini batteriologiche (Tabella 1).

I tessuti o i fluidi biologici raccolti per indagini virologiche, possono pervenire freschi, refrigerati o congelati a seconda che il conferimento al laboratorio avvenga rispettivamente subito dopo il prelievo, entro 48 ore o in tempi superiori a 48 ore dal prelievo. Se il campionamento viene eseguito con l'impiego del tampone valgono le indicazioni già riportate per l'esame batteriologico, alle quali si rimanda. Come accennato precedentemente, il materiale prelevato per indagini virologiche, può essere congelato a -20°C in attesa della consegna al laboratorio. Tale pratica non presenta controindicazioni per le successive indagini analitiche (microscopia elettronica, isolamento, PCR).

**Tabella 1:** Prospetto riassuntivo relativo al tipo di campione ed alle modalità di conservazione ottimali a seconda della prova prevista.

**Table 1:** Type of samples and method of preservations related to the laboratory examinations.

TIPO DI CAMPIONE	TIPO DI PROVA	MODALITA' DI CONSERVAZIONE OTTIMALI PRIMA DELLA CONSEGNA AL LABORATORIO
Carcassa/organi	Anatomopatologico	Refrigerazione
Carcassa/organi	Batterologico	Refrigerazione
Feci		Refrigerazione
Tamponi		Refrigerazione (evitare essiccamento)
Organi	Parassitologico	Refrigerazione
Feci		Refrigerazione (eventualmente fissare in formalina al 5%)
Sangue (EDTA)		Refrigerazione (eseguire lo striscio entro poche ore dal prelievo)
Organi	Virologico	Refrigerazione o congelamento a -20°C
Feci		Refrigerazione o congelamento a -20°C
Tamponi		Refrigerazione o congelamento a -20°C
Organi	Istopatologico	Formalina 10% - Temperatura ambiente
Sangue (eparina - tappo verde)	Chimico-clinici	Refrigerazione
Sangue (EDTA - tappo viola)	Emocromo	Refrigerazione
Sangue (tappo rosso)	Sierologico	Refrigerazione (congelamento solo dopo separazione del siero dal coagulo)

Il materiale prelevato per indagini istologiche dovrebbe rimanere immerso nel fissativo (formalina) il tempo necessario per una completa fissazione (la velocità di penetrazione nel campione è generalmente di 0,8 mm/h., con un rapporto volumetrico ottimale campione/formalina di 1/10), al termine della quale è necessario che il campione venga sezionato ed incluso in paraffina. Il tempo di fissazione deve essere valutato accuratamente onde non incorrere negli inconvenienti di ipofissazione o iperfissazione che si riflettono negativamente su tutte le successive fasi di lavorazione del campione, ivi comprese le colorazioni speciali (istochimica ed immunoistochimica), oltre che precludere una adeguata valutazione della morfologia cellulare.

I campioni da destinare ad indagini citologiche devono essere consegnati al più presto al laboratorio, in quanto il materiale non sottoposto a striscio su vetrino ha la tendenza a deteriorarsi, con la comparsa di fenomeni autolitici che alterano irrimediabilmente la morfologia cellulare, rendendo inidoneo il campione. I campioni che vengono consegnati già strisciati su vetrino, possono essere fissati lasciandoli essiccare all'aria e conservati per lunghi periodi a temperatura ambiente, avendo cura di proteggerli dalla polvere.

I campioni di sangue destinati ad indagini sierologiche possono essere consegnati al laboratorio freschi o refrigerati. Come accennato in precedenza il congelamento è riservato al siero dopo la separazione dal coagulo. I campioni in provette di litio-eparina, destinati ad indagini chimico-cliniche devono essere conservati a +4°C durante il trasporto ed il plasma separato e

successivamente congelato a -20°C fino al suo utilizzo. I campioni prelevati in EDTA da destinare alla valutazione dei parametri ematologici devono pervenire refrigerati al laboratorio che esegue le analisi, entro lo stesso giorno in cui è stato eseguito il prelievo.

### **PATOLOGIA ENTERICA E CAMPIONAMENTO.**

Il tipo prelievo e le modalità di conservazione e di invio dei campioni al laboratorio, in caso di indagini inerenti alla patologia enterica, differiscono a seconda del sospetto diagnostico e quindi dei patogeni che si vogliono ricercare (Tabelle 2 e 3). Esistono tuttavia alcuni accorgimenti con valenza generale che è consigliabile seguire:

- nel caso di conferimento dell'intestino occorre campionare materiale fresco, il tratto gastro-enterico va rapidamente incontro a fenomeni autolitici
- nel caso che il campionamento preveda il prelievo di feci è consigliabile eseguirlo direttamente dagli animali (ampolla rettale)
- è possibile prelevare i campioni direttamente dal pavimento del box, campionando esclusivamente le feci presenti nella porzione superficiale
- evitare di conferire il materiale in pool preformati (sarà il laboratorio ad eseguire gli esami in pool numericamente idonei a seconda delle indagini richieste)
- l'utilizzo dei tamponi rettali non ha particolari controindicazioni, eccezion fatta per la ricerca di *Salmonella* sp., per cui sarebbe stata dimostrata una minor sensibilità rispetto al prelievo di feci (1).

**Tabella 2:** *Principali patogeni enterici batterici in relazione con le specifiche indicazioni relative al prelievo ed ai metodi diagnostici impiegati.*

**Table 2:** *Bacterial enteric diseases, sampling and diagnostic methods used.*

<b>RICERCA</b>	<b>NECESSARIO PER LA DIAGNOSI</b>	<b>COMMENTO</b>	<b>METODICHE</b>
<i>Clostridium difficile</i>	Intestino crasso	Materiale ben conservato	1. Esame colturale: porzione refrigerata 2. Ricerca tossine (ELISA)**: porzione congelata
<i>Escherichia coli</i> (ETEC, EPEC, EDEC)*	Carcasse, intestino, feci, tamponi rettali	Non conferire materiale proveniente da animali trattati	Esame colturale, tipizzazione sierologica (Fattori di adesività)
<i>Clostridium perfringens</i>	Carcasse o intestino tenue con contenuto	Materiale fresco, ben conservato e non congelato	Esame colturale, prove di conferma, genotipizzazione, esame istologico
<i>Salmonella</i> spp.	Feci, intestino crasso	Quantità di feci non < a 10 gr. Tamponi meno sensibili	Esame colturale, prove di conferma e sierotipizzazione
<i>Brachyspira</i> spp.	Feci fresche, cieco/colon	5-10 campioni da animali sintomatici, non congelare	Esame colturale, PCR per conferma e tipizzazione
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Carcasse, intestino, feci	-	Nested PCR, Esame istologico

\* *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC), enteropatogeni (EPEC), edemigeni (EDEC)

\*\* ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

**Tabella 3:** *Principali patogeni enterici virali e parassitari in relazione con le specifiche indicazioni relative al prelievo ed ai metodi diagnostici impiegati.*

**Table 3:** *Viral and parasitic enteric diseases, sampling and diagnostic methods used.*

RICERCA	NECESSARIO PER LA DIAGNOSI	COMMENTO	METODICA
PEDV	Carcasse o feci (Sangue)	Non eseguire pool di feci; scegliere animali nella fase acuta della malattia	Rt-PCR, ELISA antigene, (ELISA anticorpi)
ROTA VIRUS	Carcasse o feci	Prelevare campioni di animali nella fase acuta della malattia	Microscopia elettronica; ELISA antigene
TGEV	Carcasse o feci	Non eseguire in pool; scegliere animali nella fase acuta della malattia	Rt-PCR Microscopia elettronica, ELISA antigene
<i>Isospora spp.</i>	Feci o intestino con contenuto	Prelievi ripetuti nel tempo, eliminazione intermittente	Microscopico
<i>Ascaris suum</i>	Feci	-	Microscopico dopo flottazione
<i>Trichuris suis</i>	Feci, carcasse	-	Microscopico dopo flottazione

#### **PATOLOGIA RESPIRATORIA E CAMPIONAMENTO.**

La diagnosi delle malattie respiratorie del suino passa attraverso la correlazione e la comprensione dei risultati delle indagini di laboratorio dirette ed indirette. In questo contesto, la dimostrazione diretta dei patogeni con metodi colturali o biomolecolari e l'evidenziazione della sierconversione nei confronti di un determinato agente eziologico, con l'impiego del doppio prelievo, costituiscono l'approccio generalmente in uso.

Per la diagnosi diretta le matrici d'elezione su cui eseguire le indagini sono i polmoni di animali deceduti con sintomatologia rappresentativa del problema, tamponi nasali, tamponi tracheali e lavaggi bronco alveolari. Nelle tabelle 4 e 5 sono riportate schematicamente le indicazioni per l'esecuzione di un prelievo appropriato a seconda del sospetto diagnostico.

**Tabella 4:** *Principali patogeni respiratori (batteri e micoplasm) in relazione con le specifiche indicazioni relative al prelievo ed ai metodi diagnostici impiegati.*

**Table 4:** *Bacterial and Mycoplasma hyopneumoniae respiratory diseases, sampling and diagnostic methods used.*

RICERCA	NECESSARIO PER LA DIAGNOSI	METODICA
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Carcassa, polmoni, tonsille (sangue)	Esame colturale, identificazione del biotipo e sierotipo. (ELISA anticorpi)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Carcassa, polmoni, BAL, tamponi nasali	Esame colturale
<i>Pasteurella multocida</i>	Carcassa, polmoni, tamponi nasali e tonsillari	Esame colturale
<i>Haemophilus parasuis</i>	Carcassa, polmoni (meglio da soggetti sacrificati); conferire materiale fresco, non congelato	Esame colturale, sierotipizzazione, PCR
<i>Streptococcus suis</i>	Carcassa, polmoni, rene e milza	Esame colturale
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Carcassa, polmoni, tamponi nasali e tracheobronchiali/BAL (sangue)	Esame istologico, PCR, IF (ELISA anticorpi)

**Tabella 5:** *Principali patogeni respiratori virali in relazione con le specifiche indicazioni relative al prelievo ed ai metodi diagnostici impiegati.*

**Table 5:** *Viral respiratory diseases, sampling and diagnostic methods used.*

RICERCA	NECESSARIO PER LA DIAGNOSI	METODICA
<i>PRRSV</i>	Polmone, campioni di saliva, seme, sangue	Rt-PCR, isolamento virale (coltura cellulare), indagini sierologiche (ELISA)
<i>SHV1 (virus della malattia di Aujeszky)</i>	Tamponi nasali, faringei, tonsillari, campioni di polmone, cervello	PCR; isolamento virale (coltura cellulare); esame istologico
<i>SIV (virus influenzali suini H1N1, H3N2, H1N2)</i>	Tamponi nasali, polmone (consegna entro 48 ore dal prelievo a +4°C; se consegna o esecuzione delle prove previste in tempi superiori conservare a -70°C (a -20°C il virus non è stabile; questo influisce sulla percentuale di isolamento)	Rt-PCR; isolamento virale (coltura cellulare, uova embrionate di pollo)
<i>PCV2</i>	Carcassa, organi linfatici (linfonodi in particolare), polmoni, intestino, ileo, reni	Esame istologico e IHC, isolamento virale, PCR

### **PATOLOGIA RIPRODUTTIVA**

Il materiale patologico raccolto da episodi di aborto nella scrofa (feti e placenta) costituisce una matrice spesso in uno stato di conservazione non ottimale ed in preda a fenomeni autolitici. La raccolta tempestiva di questo materiale, per il successivo conferimento al laboratorio, evita l'instaurarsi di processi putrefattivi, nonché fenomeni di cannibalismo ed eviscerazione dei feti, che di fatto limitano le possibilità diagnostiche. In caso di materiale prelevato in seguito ad aborto nella scrofa occorre considerare alcune norme fondamentali:

- raccogliere ed inviare al laboratorio tutti i feti appartenenti ad un determinato aborto
- se possibile evitare il congelamento (questo limita l'esecuzione di eventuali esami istologici)
- associare al conferimento dei feti un'accurata anamnesi ed un prelievo di sangue per indagini sierologiche nelle scrofe che hanno abortito.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Gardner I.A., Blanchard P.C. (2006). Interpretation of Laboratory Results. Disease of Swine. Section I, Chapter 10, 219-239.
2. Sibila M., Pieters M., Molitor T., Maes D., Haesebrouck F., Segalés J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of Mycoplasma hyopneumoniae infection. Veterinary Journal, 181, 221-231.
3. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R.B., Zimmerman J.J. (2008). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. J Vet Diagn Invest. 20(2):156-163.
4. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology 99, 1-12.

# DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI MALATTIE INFETTIVE DEL SUINO, DALLA PCR TRADIZIONALE AL SEQUENZIAMENTO DELL'AGENTE INFETTIVO RILEVATO.

PAOLO BONILAURI  
BIOLOGO DIRIGENTE

*IZSLER Sezione di Reggio Emilia, via Pitagora 2, 42124. [paolo.bonilauri@izsler.it](mailto:paolo.bonilauri@izsler.it)*

## INTRODUZIONE

La diagnostica delle malattie infettive viene di norma suddivisa in due tipologie, diretta o indiretta. Nella diagnostica diretta, viene ricercato l'agente eziologico *in toto* oppure vengono ricercati alcuni dei suoi componenti e la loro presenza è rilevata *direttamente* nel campione in esame. Nella diagnostica indiretta, vengono, invece, rilevati *anticorpi* nei confronti dell'agente eziologico. Numerose sono le tecniche molecolari che sono state applicate nella diagnostica diretta di malattie infettive nel corso degli ultimi 15 anni e anche in campo veterinario ed in particolare in diagnostica suina, il loro utilizzo è piuttosto comune e la possibilità di utilizzare queste tecniche è diffusa in tutti i laboratori veterinari a livello europeo. Le tecniche molecolari hanno come bersaglio della loro azione il rilevamento di porzioni di materiale genetico e la loro caratterizzazione, per cui sono certamente tecniche diagnostiche dirette. La reazione a catena della (DNA) polimerase, nota come PCR (Polymerase Chain Reaction) è stata sviluppata nel 1983 da Kary Mullis (USA, Berkeley University) bio-chimico, insignito del Premio Nobel per la Chimica nel 1993 per questa scoperta. Inoltre il Dr. Mullis è autore nel 1998 del libro intitolato "Ballando nudi nel campo della mente. Le idee (e le avventure) del più eccentrico tra gli scienziati moderni", un testo in cui tra le molte curiosità sulla vita di questo brillante scienziato, viene raccontato come soltanto attraverso l'utilizzo di droghe allucinogene l'autore è riuscito a raffigurare nella propria mente le molecole di DNA che venivano replicate nel corso della reazione da lui ideata e viene inoltre, riportata dall'autore una esperienza di incontro ravvicinato con una cultura aliena dalla quale lo stesso descrive di essere stato rapito a scopo di studio.

## LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERARE (PCR)

Indubbiamente, la PCR è una reazione fondamentale per tutta la moderna biologia molecolare essendo alla base di praticamente ogni altra determinazione molecolare, sequenziamento del DNA compreso, per cui è soltanto grazie alla invenzione del Dr. Mullis che il genoma umano è stato recentemente completamente sequenziato. La ragione del successo della reazione di PCR e la sua grande diffusione in ogni laboratorio diagnostico a livello mondiale, sta nella sua elevata sensibilità analitica. La reazione è, infatti, in grado cioè di rilevare anche poche particelle di materiale genetico contenute all'interno del campione in analisi, con tempi di risposta estremamente brevi e teoricamente contenuti in una singola giornata lavorativa. Inoltre la metodica è estremamente duttile e può essere applicata per rilevare la presenza di qualunque agente patogeno di cui sia nota anche soltanto una piccola porzione di genoma. Parlando di caratteristiche intrinseche alle differenti metodiche di diagnostiche, non si può non introdurre alcuni concetti relativi alla validazione delle stesse. Quando si parla di validazione in campo diagnostico, il testo di riferimento può essere il manuale OIE per test diagnostici e vaccini per animali terricoli, nel capitolo 1.1.4/5, nella versione 2010. Per validazione di una metodica diagnostica si intende la misurazione di determinati parametri (bontà teorica per gli intenti prefissati, ottimizzazione, standardizzazione, robustezza, ripetibilità, sensibilità analitica, specificità analitica, determinazione del cut-off, sensibilità diagnostica e specificità diagnostica, riproducibilità e resilienza, cioè la capacità di resistere alle differenti condizioni

di riproducibilità) della metodica stessa atti a valutare quanto la metodica sia adatta a rilevare quello che interessa cercare nel campione in esame. Il processo di validazione di una metodica diagnostica è in processo progressivo e continuo e l'utilizzo stesso della metodica nel tempo consente di determinare con sempre maggior certezza le stime dei parametri considerati. Tra tutti i parametri da determinare nel corso di una validazione, quelli su cui vale la pena soffermarsi riguardo alla PCR, sono la Sensibilità e la Specificità analitica e diagnostica. La Sensibilità analitica (ASe), nota come limite di rilevazione o LOD (limit of detection) è la porzione minima di analita contenuta nel campione rilevabile dal metodo. Per le metodiche PCR questo limite di rilevazione è di solito compreso tra 10-100 copie di target per reazione, il che corrisponde a circa 100-1000 copie di target / ml o g di campione. La Specificità analitica (ASp), riguarda la capacità del metodo di individuare soltanto la presenza del materiale genetico dell'agente in ricerca e non altri a lui filogeneticamente correlati e si traduce nella specificità dei primer e delle condizioni di reazione delle metodiche PCR. La Sensibilità diagnostica (DSe), invece rimanda alla porzione di animali di riferimento sicuramente infetti classificati come positivi dal metodo (ed un altro modo di esprimere questo parametro è il tasso di falsi negativi del test). Infine per Specificità diagnostica (DSp), si intende la porzione di animali di riferimento sicuramente non infetti classificati come negativi dal metodo (ed un altro modo di esprimere questo parametro è il tasso falsi positivi del test).

Venendo specificatamente alla reazione PCR, questa per il suo espletamento richiede DNA/RNA sufficientemente puro da poter essere amplificato (e questo prende il nome di template). Per ottenere DNA/RNA da amplificare questo deve essere estratto, cioè isolato dal campione in analisi. L'estrazione è un processo chimico / fisico che permette di isolare l'acido nucleico da proteine e altri componenti cellulari presenti e avviene tramite rottura dei tessuti, lisi cellulare, lisi proteica o loro separazione dal DNA/RNA, precipitazione alcolica del materiale genetico e Ri - sospensione / eluizione del DNA/RNA in soluzione acquosa. Viene d'obbligo ricordare qui, che il bersaglio delle reazioni di PCR non sono i microrganismi (virus o batteri) di cui mette in luce la presenza, ma il loro materiale genetico in porzioni specifiche, ma molto limitate. Questo è anche il più grande svantaggio o il più grande limite di queste reazioni. La PCR essendo una tecnica distruttiva, non fornirà mai informazioni dirette sulla vitalità dei microrganismi di cui evidenzia la presenza nel campione in analisi.

Una volta estratto il materiale genetico deve essere messo a contatto con i differenti componenti di reazione che vanno sotto il nome di "mix di reazione" (acqua, tampone di reazione, primer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Enzima di polimerizzazione del DNA - *Taq*) ed i singoli campioni contenuti in apposite provette vengono trasferiti su di una macchina nota come termociclatore (fig.1). I termociclatori sono macchine da laboratorio in grado di modificare la temperatura delle mix di reazione contenute nelle singole provette rapidamente e secondo cicli prefissati dall'operatore. Ma veniamo a descrivere quello che avviene all'interno delle provette di reazione una volta posta sul termociclatore. Come si intuisce dal nome, la reazione a catena della polimerase è una reazione che si completa attraverso la ripetizione di cicli termici uguali tra loro. Le tre temperatura fondamentali di tutte le reazioni di PCR che vengono ripetute ad ogni ciclo sono (fig.2):

1. una elevata temperatura di solito compresa tra 94°C e 96°C in cui avviene la denaturazione fisica della doppia elica di DNA, cioè la separazione del duplex in due filamenti di DNA singoli.

2. A questa segue una temperatura di molti gradi inferiore (50°C e 65°C), nota come temperatura di annealing, in cui avviene l'appaiamento dei primer alle regioni a loro complementari. I primer, sono corte sequenze di DNA a singolo filamento (18-28 bp) che delimitano la regione che verrà amplificata durante la reazione. A questa temperatura i primer riconoscono specificatamente le regioni a loro complementari quando queste sono presenti nel campione in analisi e quindi, la temperatura di annealing rappresenta la chiave per la

specificità delle reazioni PCR, ma non solo per questa, anche la sensibilità delle reazioni PCR è influenzata dalla temperatura di annealing. Infatti se questa temperatura fosse troppo alta, i primer non riconoscerebbero le regioni a loro complementari anche quando queste fossero presenti (scarsa sensibilità), mentre se la temperatura di annealing fosse troppo bassa, i primer potrebbero riconoscere anche regioni solo in parte a loro complementari e consentire, in ultima analisi, l'amplificazione di target non specifici (falsi positivi). 3. Infine, la terza temperatura è una temperatura ottimale per gli enzimi di amplificazione del DNA utilizzati, che provenendo da batteri termoresistenti, hanno un ottimo di lavoro a temperature elevate. Nella maggior parte dei casi, l'enzima di amplificazione utilizzato è una DNA polimerasi termostabile isolata originariamente dal microrganismo termofilo *Thermus aquaticus* da cui prende il nome *Taq*. La temperatura di allungamento è quindi di solito impostata a 72°C ed a questa temperatura, l'enzima riconosce la presenza di un primer appaiato ad un singolo filamento di DNA e questo fornisce l'innescò per la polimerizzazione del DNA, cioè per la copia complementare del singolo filamento di DNA partendo dalla fine del primer. Ripetendo questa reazione in modo ciclico, è possibile in 30 cicli di reazione ottenere 2<sup>30</sup> copie del materiale genetico di partenza, delimitato dalle regioni specificatamente riconosciute dai primer e quindi evidenziare la teorica presenza anche di una singola copia di DNA del microrganismo in ricerca.

Al termine della reazione di PCR i prodotti della reazione vengono caricati su di un gel di agarosio. Applicando a questo un campo elettrico in presenza di un idoneo tampone elettroforetico e di un colorante (Et-Br, SYBR green ecc) in grado di intercalare il DNA durante o dopo la corsa elettroforetica, il DNA essendo un poli-anione migra verso il polo positivo ad una velocità che dipende dal peso molecolare del frammento. Posizionando il gel su di un transilluminatore a luce UV è possibile rilevare la presenza di una banda di amplificazione quando presente, grazie al fatto che, in queste condizioni, il colorante intercalato nel DNA emette fluorescenza visibile (fig.3).

## **DIFFERENTI TIPOLOGIE DI PCR E LORO APPLICAZIONI**

La reazione di base è sempre questa per tutte le differenti tipologie di PCR, ma queste possono differire a seconda del materiale genetico di partenza o del numero di coppie di primer utilizzate in una singola reazione, ma vediamo alcune. Se l'agente eziologico di cui occorre evidenziare la presenza ha come materiale genetico RNA, dovrò estrarre dal campione di partenza RNA anziché DNA e poi retrotrascrivere il campione di RNA in cDNA (DNA copia complementare dell'RNA) tramite apposita reazione di retrotrascrizione (trascrittasi inversa). In questo caso, la PCR prende il nome di RT-PCR cioè una PCR preceduta da una reazione di Retrotrascrizione in vitro. Per ottenere questa copia complementare dell'RNA estratto in cDNA, si utilizzano enzimi di origine retrovirale che producono DNA su stampo RNA. La RT-PCR quindi è una metodica in due passaggi:

1. Retrotrascrizione RNA->cDNA
2. PCR partendo da cDNA retrotrascritto.

In diagnostica suina, la RT-PCR si applica principalmente nella ricerca di virus a RNA quali PRRSV, SIV, Coronavirus (PED, PRCV, TGE), EMCV.

La nested PCR (nPCR) o PCR annidata, è una doppia PCR eseguita sulla medesima regione di DNA. Schematicamente dal DNA estratto si esegue una prima PCR e dal prodotto della 1° PCR si esegue una 2° PCR annidata alla prima. La seconda coppia di primer si appaia ad una regione compresa all'interno del primo frammento di PCR ottenuto. La nPCR è una PCR che ha una sensibilità analitica almeno 10-100 volte superiore ad una singola PCR. Inoltre la nPCR è maggiormente specifica, 2 volte in due regioni differenti e annidate i primer devono riconoscere il DNA bersaglio, ma è più esposta a problemi sia di Sensibilità che di Specificità diagnostica (falsi positivi, dovuti ad inquinamento e falsi negativi dovuti alla variabilità

genetica dei ceppi). La nPCR in diagnostica suina si applica ogni qual volta si ritiene che la quantità di DNA/RNA bersaglio contenuta nel campione sia o molto scarsa o non facilmente amplificabile alcune applicazioni sono:

ricerca di *Lawsonia intracellularis* da feci, che rappresentano un materiale di partenza difficile da processare per la presenza di inibitori che diminuiscono la sensibilità delle reazioni singole, la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* da tamponi nasali, dove si sa che anche quando positivi, sono presenti pochi microrganismi oppure la ricerca di PRRSV da seme, dove si sommano i due problemi, presenza di possibili inibitori e poche particelle virali presenti.

La multiplex PCR è una tecnica che in realtà consiste in più PCR eseguite contemporaneamente all'interno della stessa provetta. In queste metodiche, invece di una coppia di primer se ne mettono due o più di due coppie. Le multiplex PCR rilevano contemporaneamente tanti target quante coppie di primer sono state inserite nella reazione. Permettendo di rilevare, differenti target di PCR contemporaneamente, prometterebbe minori costi e minori tempi di risposta e offrirebbe la possibilità di effettuare screening ad ampio spettro per più patogeni. Purtroppo le multiplex PCR hanno un grosso limite, che sta nella minore sensibilità delle multiplex rispetto alle singole PCR, che compongono la reazione. Di fatto le multiplex vengono applicata soltanto quando non è richiesta elevata sensibilità di reazione come nella tipizzazione cellulare (*Brachyspira*, geni codificanti tossine *E.coli*, geni codificanti tossine *Cl. perfringens*). Una eccezione a questo ragionamento sta nella metodica utilizzata a per il rilevamento del virus della PRRS. In IZSLER a livello di tutte le sezioni diagnostiche la metodica applicata per il rilevamento della PRRSV è una metodica che utilizza una miscela di 3 primer, quindi a rigor di logica una multiplex, ma in questa particolare reazione viene utilizzato un primer comune a EU e US e due primer uno specifico per i ceppi EU (distante 180bp dal primo) e l'altro primer specifico per ceppi US (distante dal primo 280bp). In questo modo è possibile rilevare la presenza di entrambi i genogruppi del virus anche se presenti contemporaneamente nel campione in analisi, non perdendo significativamente in sensibilità della reazione.

In ultima la PCR RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism, consiste in una PCR seguita da digestione del frammento ottenuto con un enzima di restrizione in grado di tagliare il frammento in presenza di determinate sequenze di DNA riconosciute dall'enzima di restrizione utilizzato. I polimorfismi in questi frammenti di restrizione permettono di tipizzazione del frammento di PCR ottenuto. Applicazioni di questa metodica di rilievo in patologia suina sono casi limitati e particolari come la tipizzazione batterica delle Clamidie, ed alcune tipizzazioni virali per scopi di ricerca (PRRSV, PCV2).

Ultima nata, nello spettro delle reazioni della polimerase, la Real Time PCR o PCR in tempo reale. Durante la Real time PCR il procedere della reazione e quindi la formazione di nuove copie del templatò è monitorato in tempo reale e non rilevato a fine reazione tramite elettroforesi su gel di agarosio. Tre sono le principali chimiche di reazione della Real Time PCR, Sybr green, Sonde a Idrolisi (Taqman®) e Sonde a Ibridazione (FRET). Senza entrare nei dettagli delle tre differenti applicazioni di queste chimiche di reazione, impiegate, comunque tutte permettono attraverso l'emissione di fluorescenza rilevabile da appositi strumenti, di monitorare la formazione di nuove molecole di templatò durante l'amplificazione (fig.4). Il vantaggio di questa tecnica è che questa possibilità di seguire la formazione di nuove molecole di DNA durante la reazione di PCR permette di rendere quantitativa la PCR. La Real Time PCR, infatti a differenza delle PCR tradizionali in cui la positività è rilevata al termine delle reazioni (end-point PCR) permette non soltanto di dire se un campione è positivo o negativo, per la presenza di DNA di questo o di quest'altro agente eziologico, ma permette anche di dire quante copie genomiche di quel agente sono contenute nel campione in analisi. La quantificazione tramite Real Time PCR può essere

1. Assoluta (per confronto con standard a concentrazione nota) o

## 2. Relativa (per confronto con un DNA differente dal target ma sempre presente)

La quantificazione relativa è una quantificazione che viene poco utilizzata in diagnostica delle malattie infettive, ma che permette ad esempio di rilevare la presenza di DNA OGM, in un mangime ad esempio, in quantità superiore alla soglia dell'1% ammissibile legalmente senza doverne dichiarare la presenza in etichetta. Questa soglia 1% di ingrediente OGM è determinata in confronto, *relativamente*, alla quantità di ingrediente non OGM contenuto.

In diagnostica delle malattie infettive del suino, viene utilizzata la quantificazione assoluta delle copie di DNA contenute del campione in analisi. Questa tipologia di quantificazione, prevede di costruire delle rette di regressione o di calibratura, con standard a concentrazione nota di DNA dell'agente eziologico in ricerca. Una volta costruita questa retta di regressione sarà possibile calcolare la concentrazione (numero di copie genomiche / ml) ignota dell'agente eziologico nel campione in analisi (fig.5).

Oltre a questa importante caratteristica, le Real Time PCR, presentano, elevata sensibilità sia analitica (ASe) che di norma è considerata equivalente ad una nPCR (10-100 volte più sensibile di una PCR tradizionale), minori problemi di inquinamento da prodotto amplificato evitando di dover evidenziare la presenza delle bande di amplificazione attraverso un gel di elettroforesi. A questi vantaggi, si oppongono problemi di inibizione della reazione da monitorare durante la reazione, che potrebbero risultare in taluni casi maggiori rispetto alle corrispondenti reazioni tradizionali e introducono un elemento di novità, la presenza di reazioni che necessitano di conferma ( $ct > 36^\circ$  ciclo), che vengono di norma classificate come dubbi.

A parere dello scrivente, le Real Time PCR in diagnostica delle malattie infettive in campo suino, dovrebbe essere applicata, quando non posso farne a meno, cioè quanto mi interessa quantificare la presenza di un agente eziologico perché mi necessitano informazioni che soltanto attraverso la quantificazione posso ottenere. I casi riguardano il Circovirus suino tipo 2, PCV2, per una diagnosi molecolare di PMWS (Post Weaning Multisystemic Wasting Disease) ed il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva suina (PRRSV) quando mi occorre la quantificazione della viremia, principalmente per scopi di ricerca o per pianificare interventi manageriali di esposizione programmata degli animali da rimonta al virus dell'allevamento. Un esempio di applicazione della quantificazione delle viremie osservabili in sieri suini conferiti per scopi analitici presso la sezione di Reggio Emilia IZSLER nel corso dell'anno 2006 e reperibile in (Bonilauri et. al 2007), dove in media furono osservate all'incirca  $10^5$  copie di virus per ml di siero, in 4 differenti allevamenti testati. Un aggiornamento di questo dato, prevede che ad oggi, in più di 150 campioni di siero analizzati con metodica Real Time PCR la viremia osservata è risultata compresa tra, un minimo di  $10^3$  copie cDNA / ml di siero, vicino al LOD del metodo, ed un massimo di  $10^8$  copie cDNA / ml siero. Ovviamente l'entità della viremia dipende dalla fase di viremia stessa dei soggetti campionati, dall'età degli animali e da numerosi altri fattori intrinseci ai singoli animali.

Discorso differente nell'infezione da PCV2 e nelle malattie ad esso collegate PMWN e PCVD, dove la carica virale presente nei soggetti malati è determinata ai fini di una diagnosi molecolare della malattia, in quanto la semplice presenza del virus (positività alla PCR tradizionale) non è ritenuta utile a fini diagnostici.

In letteratura, i lavori cui a cui si riferisce per una diagnosi molecolare di PMWS sono fondamentalmente due. Il primo di questi è Brumborg et al. (2004). In questo lavoro, gli autori descrivono i risultati ottenuti su 14 campioni di tessuti e siero di animali con PMWS provenienti da due allevamenti svedesi con segni clinici da PMWS, 20 linfonodi mesenterici di soggetti sani prelevati al macello e 80 sieri di animali sani provenienti dagli stessi 2 allevamenti dei soggetti con PMWS. L'entità della carica virale per PCV2 nei soggetti clinici con PMWS sia da siero che da tessuti è risultata in questo lavoro significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore rispetto ai soggetti sani, ed il cut off proposto da questi autori è  $10^6$ - $10^7$  copie virali per ml o per 500mg di tessuto, per distinguere i due gruppi di soggetti. Il secondo

lavoro di riferimento è stato presentato da Oliero et al. (2004), in questo contributo gli autori descrivono i risultati ottenuti su 87 sieri di soggetti conferiti all'istituto di patologia suina di Barcellona tra il 1997 e il 2002. I sieri di animali affetti PMWS sono stati suddivisi in tre categorie in base alla gravità delle lesioni macroscopiche e linfonodali osservate negli animali. Questi sono stati i gruppi analizzati in questo studio:

27 soggetti sono stati definiti a PMWS lievi, 24 soggetti con PMWS moderata, 24 soggetti con PMWS grave. Inoltre, sono stati inseriti in questo studio anche 12 soggetti con PDNS. Sia il gruppo dei soggetti con lesioni gravi che il gruppo dei soggetti con lesioni moderate hanno mostrato titoli virali significativamente maggiori dei soggetti con lesioni lievi e con PDNS. Il Cut off proposto da questi autori per la diagnosi molecolare di PMWS soltanto attraverso l'analisi della viremia sierica è  $10^7$  copie / ml di siero.

Per quel che riguarda l'applicazione di queste metodiche alla routine diagnostica praticata presso il laboratorio dell'autore di questa comunicazione, possiamo riferire i risultati di sieri di campo provenienti da 3 differenti allevamenti con sintomatologia clinica da PMWS. Nella medesima giornata sono stati prelevati campioni di siero in soggetti in 3 fasi della sintomatologia:

25 soggetti in fase preclinica (5 settimane di vita), 25 soggetti in fase clinica (8-9 settimane di vita) e 25 soggetti in fase post clinica (12-15 settimane di vita). Questi sono stati analizzati con Q-PCR secondo quanto riportato da Olvera et al. (2004). I soggetti in fase preclinica non avevano quantità rilevabili di virus nel siero, mentre i soggetti della fase clinica avevano un titolo significativamente ( $p < 0.01$ ) maggiore (media log copie PCV2) / ml di siero = 6,77) rispetto ai soggetti della fase post clinica (media log copie PCV2) / ml di siero = 5,57).

In base alla nostra esperienza il cut-off molecolare per una diagnosi presuntiva di PMWS soltanto sulla base della Real Time QPCR è:

$10^6$  copie di virus / ml di siero

$10^7$  copie di virus / g di tessuto.

## **IL SEQUENZIAMENTO**

Una tecnica molecolare che è divenuta di uso piuttosto comune anche in sanità suina, soprattutto per quel che concerne la gestione del virus della PRRS in allevamento è il sequenziamento di porzioni del genoma virale. La reazione di sequenziamento è una particolare reazione di PCR in cui oltre ai normali dNTP (deossi nucleotidi trifosfato) sono inseriti dei ddNTP di-deossi nucleotidi trifosfato, marcati con 4 fluorofori differenti. Una volta che durante la reazione di amplificazione uno di questi ddNTP marcati viene incorporato nella sequenza questo non potendo essere ulteriormente allungato impone lo stop alla reazione liberando l'enzima di sequenziamento. In questo modo, casualmente si formeranno frammenti di differenti dimensioni, da una base dopo il primer a circa 400, 500 basi dopo il primer. Questi frammenti possono essere separati tramite elettroforesi capillare o comunque su gel di acrilammide con risoluzione di una base e rilevati grazie alla marcatura fluorescente. Si sequenziano entrambi i filamenti, in due reazioni separate e la sequenza di questi è controllata in modo complementare. Il risultato di una reazione di sequenza è la sequenza dei 4 nucleotidi (A,C,G,T) che compongono il genoma virale e che consentono di predire la sequenza della proteina di cui contengono le informazioni, in base al codice genetico (Fig.6). Una volta ottenute più sequenze è possibile allinearle tra loro utilizzando software di allineamento appositamente sviluppati. Questi software confrontano le sequenze a due a due e costruiscono matrici di similarità genetica secondo specifici algoritmi. I più utilizzati sono contenuti nel software gratuito MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007) che utilizza al suo interno il software CLUSTAL W per l'allineamento delle sequenze. Dalle matrici di similarità è possibile costruire alberi filogenetici sempre utilizzando tecniche statistiche applicate alla biologia molecolare e specifici algoritmi di calcolo, che consentono di disporre

sui medesimi bracci dell'albero le sequenze che risultano tra loro più simili (imparentate). Semplificando, gli alberi filogenetici rappresentano graficamente le relazioni di parentela tra le sequenze appaiate, più vicine le sequenze saranno nell'albero più imparentati saranno i ceppi. Gli alberi filogenetici si suddividono in due grandi raggruppamenti:

1. Radicati (rooted)
2. Non radicati (unrooted)

I primi sono alberi che si sviluppano a partire da un nodo centrale che rappresenta il più recente antenato comune delle sequenze che si trovano nell'albero. Questi tipi di alberi filogenetici dunque, sono in grado di fornire informazioni sia sulla correlazione genetica esistente tra gli organismi presenti sulle sue ramificazioni, sia sui rapporti evolutivi che intercorrono tra gli stessi. Ma si basano sull'assunzione che all'interno delle sequenze che si stanno raggruppando ci sia un antenato comune a tutte. Se questa assunzione non è supportata da evidenze forti, è meglio utilizzare gli alberi Non radicati. Dove ci si limita a fornire le relazioni genetiche che intercorrono tra le sequenze rappresentate, senza assumere relazioni di parentela evolutiva tra le stesse.

## **UTILIZZO E SIGNIFICATO DEL SEQUENZIAMENTO DEL VIRUS DELLA PRRS**

Lo stato dell'arte nell'utilizzo del sequenziamento della PRRSV passa attraverso due incontri, ad opinione dello scrivente, fondamentali organizzati sull'argomento. Il primo di questi momenti, fu organizzato a Parma dal Prof. Martelli nell'ottobre 2005 ed era intitolato "PRRSv Fatti vs Speculazioni". In questo convegno intervenne il prof. Murtaugh dell'università del Minnesota. Durante il suo intervento il relatore espresse alcuni importanti fatti che richiamiamo qui. Quasi ogni isolato di PRRSV sarà diverso per quanto riguarda la sequenza delle basi da ogni altro stipite di virus. In alcuni casi queste differenze si riflettono su alcune caratteristiche del virus come la virulenza o sulla specificità immunitaria, in altri casi le mutazioni rimarranno silenti o non modificheranno le caratteristiche biologiche dei virus. In ogni caso, non ci sono ancora prove scientifiche definitive circa quale parte o quali parti determinano queste proprietà fenotipiche. Era allora, ed è tuttora, impossibile prevedere la relativa virulenza, immunogenicità e la specificità immunitaria dei ceppi solamente sulla base della loro sequenza, indipendentemente da quale porzione di virus (quale ORF) si prenda in considerazione. Inoltre mentre, due virus identici sono sempre omologhi, due virus differenti non sono sempre eterologhi, questa distinzione dipende dalla distanza nucleotidica (distanza evolutiva). Inoltre come detto sopra, i cambiamenti nella sequenza amminoacidica possono non aver effetto sulla struttura e sulla funzione della proteina (mutazioni fenotipicamente ininfluenti). Due ceppi sono eterologhi se non hanno un antenato comune recente. Purtroppo, però non è quasi mai possibile sapere la provenienza o i progenitori dei ceppi isolati in campo ed è quindi, necessario assumere che ceppi simili geneticamente siano imparentati tra loro. Sfortunatamente nessuno può stabilire con certezza un cut-off, oltre il quale si possa stabilire con certezza che due virus sono eterologhi. Il virus della PRRSV sembra mutare con un tasso massimo uguale a 0.5-1% all'anno (in media osservando lo stesso ORF). Partendo da queste osservazioni, ceppi simili al 95% potrebbero aver avuto un antenato comune non prima di 5-10 anni, per cui vengono comunemente considerati *eterologhi*. Però questa distanza non va considerata in modo assolutistico, se ad esempio un allevamento è stabile per PRRS i ceppi isolati saranno sempre molto simili tra di loro (98-100%). Se in un allevamento di questo tipo, incontriamo un ceppo simile al 96% (cioè differente per meno del 5%) questo è comunque molto più probabile che sia di nuova introduzione piuttosto che essersi evoluto da una popolazione virale preesistente, con tutto quello che una osservazione del genere può comportare. Per questo, risulta di fondamentale importanza archiviare più sequenze nel tempo nello stesso allevamento, in modo da poter monitorare l'introduzione di nuovi

ceppi in situazioni di stabilità, ed eventualmente rivedere alcune pratiche gestionali e di biosicurezza.

Infine, sono state recentemente descritte nuove sottovarianti virali del PRRSV in paesi dell'est europeo. Stadejek et. al. (2006) ha ipotizzato la possibilità di suddividere il genotipo europeo in 4 differenti sottotipi in base all'eccezionale variabilità osservata anche in lunghezza nel ORF7 del virus (Fig7), la porzione di genoma che contiene le informazioni genetiche per la nucleoproteina virale e che era considerata, a torto, la regione più stabile del genoma virale. Lettonia e Lituania sono due nuove nazioni della Comunità europea che hanno al loro interno una circolazione di ceppi di PRRS molto differenti da quelli circolanti in EU ovest. Questo potrebbe creare criticità sia di copertura vaccinale sia di capacità diagnostica dei test attualmente disponibili (soprattutto per quel che riguarda le PCR) di cui è bene tenere presente quando si dovessero osservare risultati di laboratorio inattesi e negativi, a fronte di lesioni evidenti a livello dei tessuti analizzati o dimostrazioni cliniche chiaramente riferibili alla circolazione del virus. In queste condizioni, tecniche di diagnostica diretta, più classiche come l'isolamento virale, dovrebbero essere prese in considerazione, in attesa di sviluppare nuove metodiche su base PCR in grado rilevare con sicurezza anche la presenza di queste nuove varianti del virus.

### **Bibliografia**

K. Mullis. *Ballando nudi nel campo della mente*. Baldini Castaldi Dalai editore, Milano 2005.

O.I.E. manual for diagnostics test and vaccines for terrestrial animal. 2010. Chapter 1.1.4/5. Principles and methods of validazion of diagnostic assay for infectious diseases.

Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M.. Rapida rilevazione e quantificazione della presenza di PRRSV genotipo EU tramite metodica Real Time RT-PCR. Possibili utilizzi e applicazione in campo. Atti del XXXIII convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Modena (MO) 29-30 Marzo 2007, 243-251

Brunborga I. M., T. Moldalb, C. M. Jonassen. (2004). Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 122 (2004) 171–178.

Olvera A., M. Sibila, M. Calsamiglia, J. Segalés, M. Domingo. (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. *Journal of Virological Methods* 117 (2004) 75–80.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

Stadejek T., M.B. Oleksiewicz, D. Potapchuk, K. Podgórska. (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *Journal of General Virology* (2006), 87, 1835-1841.

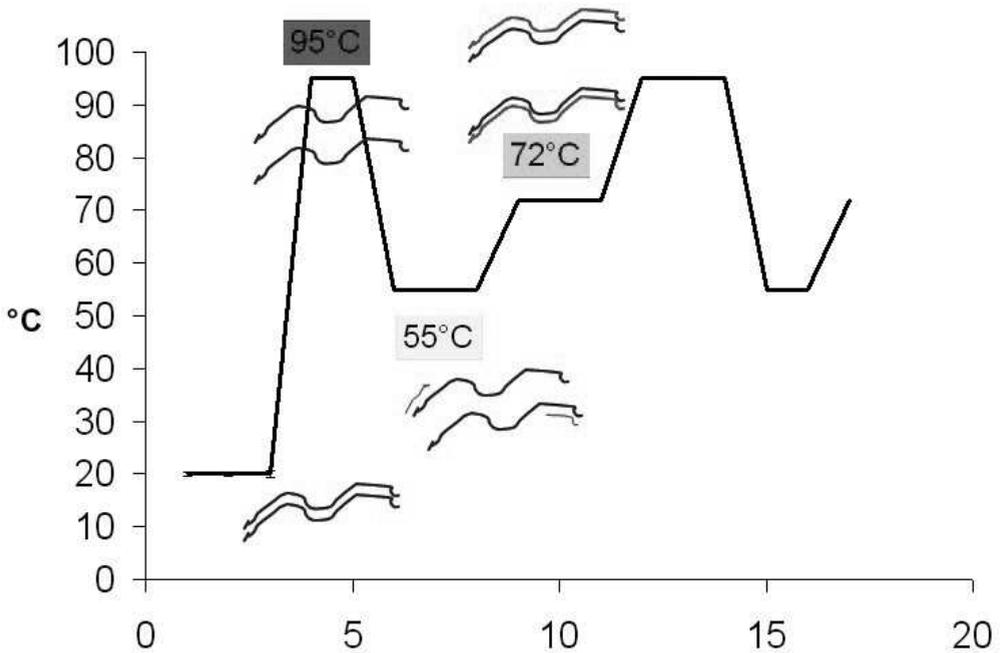
**Fig.1**

*Termociclatore. Macchina in grado di modificare rapidamente la temperature delle provette contenenti le mix di reazione in essa posizionate, consentendo alla reazione di PCR espletarsi.*



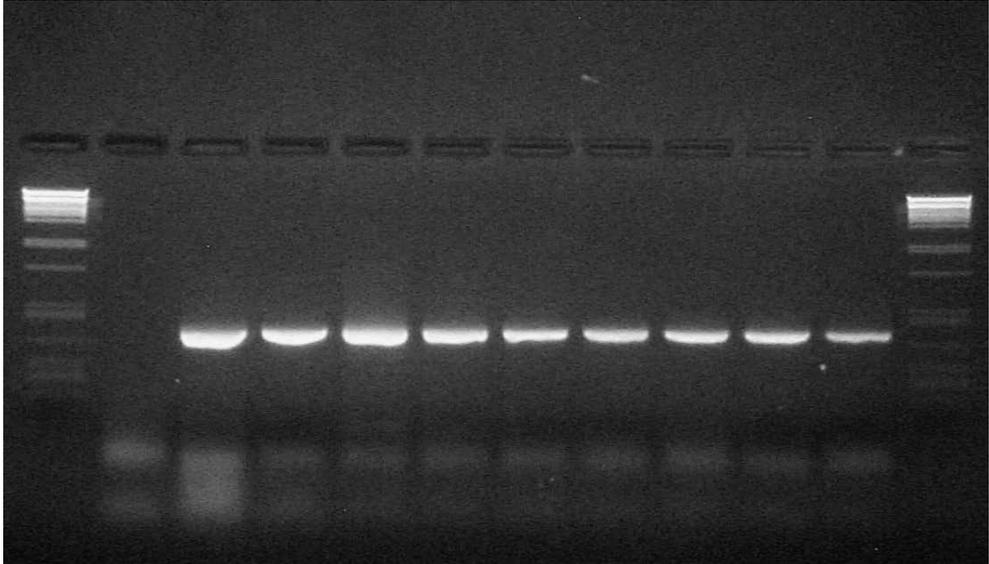
**Fig.2**

*Rappresentazione grafica delle 3 temperature cardine di una reazione di PCR*



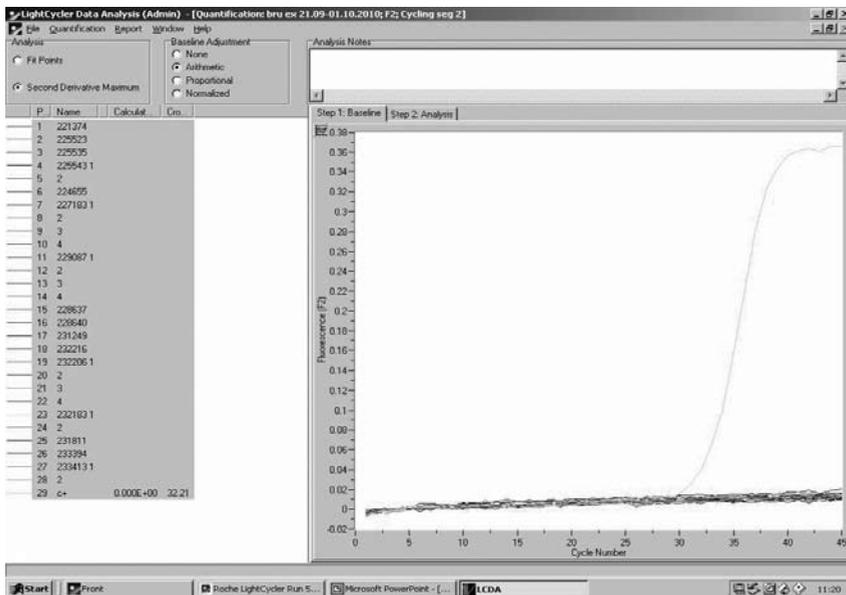
**Fig.3**

Immagine di gel di elettroforesi contenente campioni positivi per la presenza del virus della PRRS, di ceppo Europeo. Nella prima linea e nell'ultima è contenuto un marcatore di peso molecolare, che consente di stimare il peso della banda di amplificazione ottenuta nei campioni. La fluorescenza emessa dal marcatore intercalante permette di visualizzare il DNA amplificato.



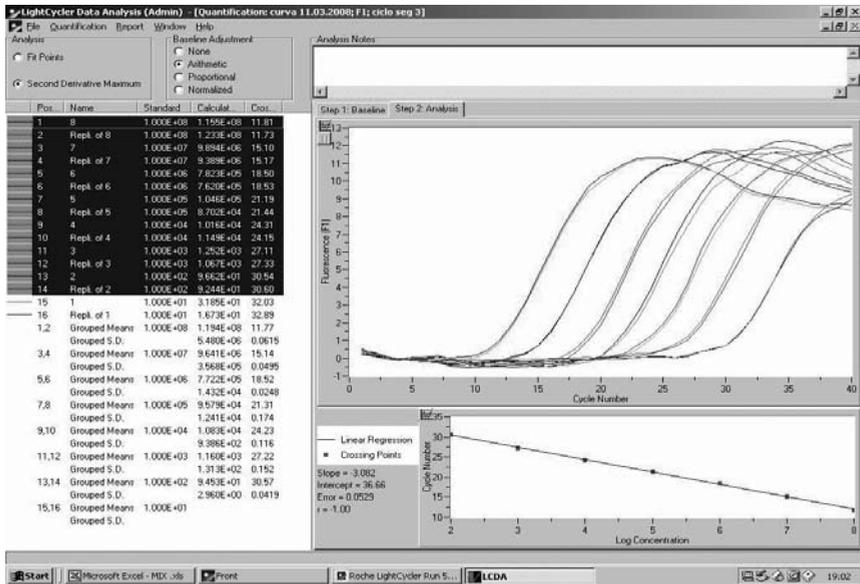
**Fig.4**

Risultato di una reazione di Real Time PCR. Il grafico rappresenta la misurazione della fluorescenza emessa da ogni campione durante l'amplificazione. La curva dall'andamento sinusoidale rappresenta una amplificazione positiva.



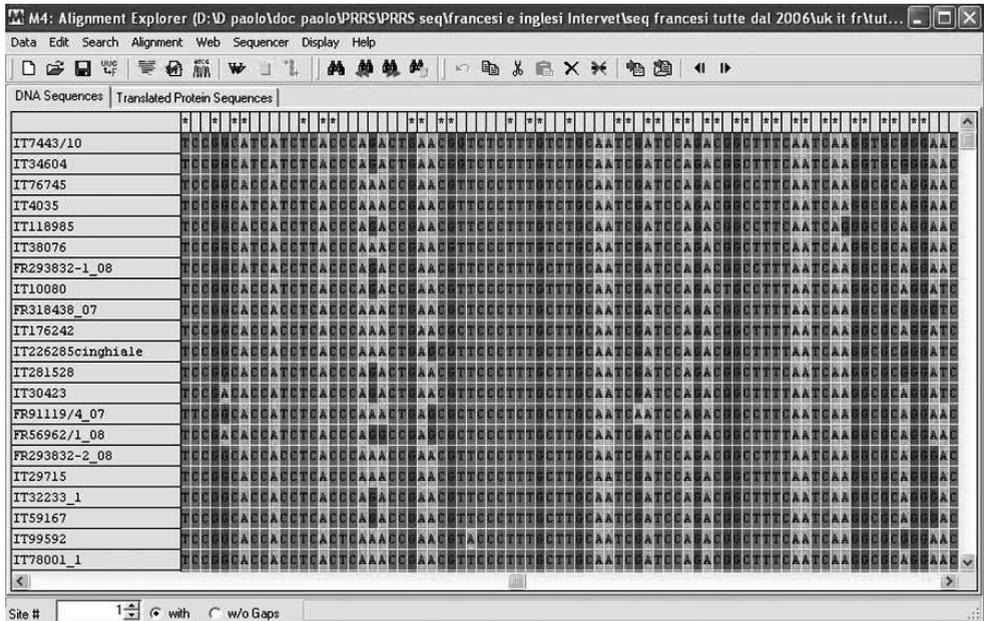
**Fig.5**

Risultato finale di una Real Time PCR di quantificazione assoluta. Nell'esempio, attraverso l'utilizzo di standard a concentrazione nota di DNA del target di reazione è possibile costruire rette di regressione che consentono di quantificare il DNA contenuto nei campioni a titolo ignoto.



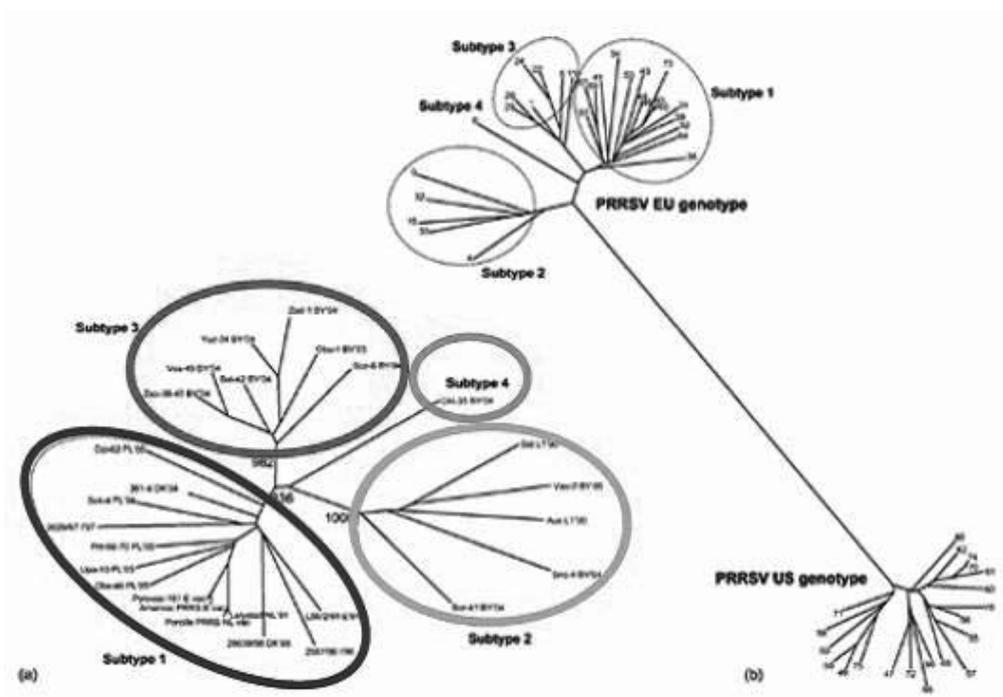
**Fig.6**

Allineamento di sequenza del ORF7 del PRRSv ottenuto attraverso l'utilizzo del software MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007).



**Fig.7**

*Alberi non radicati rappresentanti la proposta di suddivisione del virus europeo della PRRSV in 4 sottotipi in base alla variabilità genetica anche in lunghezza, osservata nella regione codificante per la nucleoproteina virale (ORF7), vedi Stadejek (2006).*





ATTI DEL XXXVII MEETING ANNUALE

**TAVOLA ROTONDA  
RIPRODUZIONE E PERFORMANCE - I**

*Piacenza, 24-25 marzo 2011*



# GESTIONE DEL PARTO E DELL'INIZIO DELLA LATTAZIONE NELLA SCROFA AD ALTA PROLIFICITÀ

O.A.T. PELTONIEMI

*Dept Production Animal Medicine  
Faculty of Veterinary Medicine  
University of Helsinki*

## INTRODUZIONE

La scrofa ad alta prolificità, definita come una scrofa che partorisce 16 o più suinetti nati vivi, rappresenta una sfida nella gestione della riproduzione in un allevamento di scrofe (Boulot et al., 2008). Dal punto di vista della gestione di tali animali, l'alimentazione gioca un ruolo chiave. Questo articolo si focalizzerà principalmente sulle recenti ricerche relative all'alimentazione della scrofa e di come questa influisca sulla gestione di: parto, lattazione e ciclo estrale. Verranno descritte le recenti acquisizioni riguardano l'uso di una dieta ricca di fibre per le scrofe durante il periodo precedente il parto e il suo effetto benefico sulla funzione intestinale e sulla durata del parto (Oliviero et al., 2009). Oltre all'alimentazione, anche il tipo di sala parto (gabbia vs box; vuoto vs arricchito) appare come un fattore critico nel determinare il corso del parto. I nostri ultimi risultati suggeriscono che impedire alla scrofa di esibire un comportamento di preparazione del nido (Algeri e Uvnäs - Moberg, 2007), prolunga il parto in media di 90 minuti (Oliviero et al, 2008; 2009). Inoltre, alimentare le scrofe con una dieta ricca di fibre durante la gravidanza, oltre ad essere una strategia alimentare utile dal punto di vista del benessere, sembra aumentare l'assunzione di alimento ad libitum durante l'allattamento. Questo effetto sembra influenzare l'incremento medio giornaliero dei suinetti, soprattutto durante il periodo neonatale (Quesnel et al., 2009, Peltoniemi et al., 2009). La quantità di alimento assunta dalle scrofe durante la lattazione, d'altra parte, è un fattore chiave per incrementare la secrezione di gonadotropina e lo sviluppo del follicolo durante la lattazione, tuttavia, questi effetti alimentari diventano più evidenti verso la fine della lattazione (Kauffold et al., 2008). La crescita del follicolo dopo lo svezzamento, innescata dalle gonadotropine FSH e LH, si verifica tanto più velocemente quanto migliore è la stimolazione da parte delle gonadotropine prima dello svezzamento (Prunier e Quesnel, 2000; Kauffold et al, 2008).

### **Parto regolare**

Un parto che si conclude con successo può essere definito come un parto durante il quale si verificano le seguenti condizioni: (1) le scrofe possono esibire un comportamento specie specifico di preparazione del nido, (2) la durata del parto non supera le 5 ore, (3) tutti i suinetti della nidiata nascono vivi (4) tutti i suinetti assumono colostro durante la prima poppata. Dato che alla fine della gravidanza i feti crescono in fretta, vi è quindi la necessità di aumentare l'assunzione di energia da parte della scrofa. Una strategia alimentare comunemente utilizzata è quella di mettere le scrofe in regime alimentare di lattazione durante il periodo prima del parto. Pur essendo una strategia comprensibile dal punto di vista dell'assunzione di energia, d'altra parte non tiene conto della funzionalità intestinale durante e subito dopo il parto. Abbiamo osservato che le scrofe alimentate con una dieta tradizionale di lattazione, con il 3,8% di fibra

grezza prima del parto, hanno mostrato una maggiore incidenza di costipazione fino ad un 20% per diversi giorni dopo il parto (Oliviero et al., 2009).

La funzionalità intestinale rallenta durante il parto e comunque la crescita eccessiva di batteri nell'intestino, utilizzando una dieta ad alto contenuto energetico, può provocare l'attivazione del GALT (tessuto linfatico associato) (Oliviero et al, 2009; Reiner et al, 2009). L'attivazione del sistema GALT stimolerebbe il rilascio di PGE2, che può ulteriormente sopprimere la funzionalità intestinale fino al verificarsi di una fuoriuscita attraverso la parete intestinale di endotossine, che inducono una risposta sistemica e i sintomi clinici che si rilevano nella sindrome di disgalassia post partum, PPDS (Reiner et al. 2009). Pertanto, questa situazione dovrebbe essere evitata con qualunque mezzo.

Le misure tradizionali per contrastare la stipsi nella scrofa contemplano la somministrazione di lassativi come il sale di Glauber, una miscela di semi di lino cotto e i lassativi commerciali, mentre le nostre esperienze individuano come misura preventiva l'aggiunta di più fibra nelle diete per scrofe prima del parto (Oliviero et al., 2009). Apportare un contenuto di fibra grezza del 7-11% prima del parto appare infatti come una misura adeguata per prevenire la costipazione ed è quindi importante per una corretta gestione del parto (Oliviero et al, 2009; Quesnel et al, 2009; Peltoniemi et al, 2009). La prima funzione benefica di una dieta ricca di fibra è il miglioramento dell'attività intestinale (Oliviero et al., 2009). Tuttavia, sono stati riportati anche altri effetti positivi relativi all'uso di diete ad alto contenuto di fibre. Questi includono sia il miglioramento dell'immunità intestinale, dovuta ad un'aumentata produzione di mucina, sia un più efficiente dell'utilizzo dell'energia degli alimenti consumati.

L'assunzione di acqua da parte della scrofa prima del parto è un parametro importante da monitorare, in quanto è alla base della produzione di latte. In media, è stato dimostrato che le scrofe bevono 10-30 litri di acqua in prossimità del parto (Oliviero et al., 2009). Tuttavia, in tale studio, la variazione nell'assunzione di acqua tra singole scrofe era considerevolmente elevata e le scrofe alimentate con la dieta ricca di fibre bevevano molto di più delle scrofe alimentate con una dieta tradizionale. Questa differenza rispetto alla dieta tradizionale pre-parto poteva essere spiegata o dall'effetto stimolante delle fibre sull'assunzione di acqua, o dall'aumentato volume associato ad una dieta più ricca di fibre (Oliviero et al., 2009). Qualunque fosse la causa, questi risultati confermano l'efficacia dell'uso di diete contenenti più fibra prima del parto. Il flusso normale raccomandato di acqua da bere dagli abbeveratoi a succhiotto è di 3-4 litri / minuto e questo è uno dei più semplici parametri da misurare per valutare lo stato di salute nell'unità parto. I dati ottenuti dimostrano che quando alle scrofe non è data la possibilità di esprimere il comportamento di preparazione del nido, hanno concentrazioni maggiori di cortisolo circolante prima del parto e concentrazioni minori di ossitocina durante la fase di espulsione dei suinetti (Figura 1; Oliviero et al, 2008a). Dal punto di vista pratico, tuttavia, forse l'osservazione più importante è quella relativa alla durata del parto. I dati ottenuti nel nostro esperimento indicano che se le scrofe non hanno la possibilità di preparare il nido, il tempo per partorire la nidiata è in media di 1,5 ore più lungo (Figura 1; Oliviero et al., 2008a, 2009). Inoltre, l'intervallo tra la nascita di ogni suinetto è risultato notevolmente più lungo nelle scrofe che non avevano a disposizione materiale di preparazione del nido (25 minuti gabbia vs 16 minuti box; Oliviero et al, 2008a).

## Duration of farrowing and Oxytocin

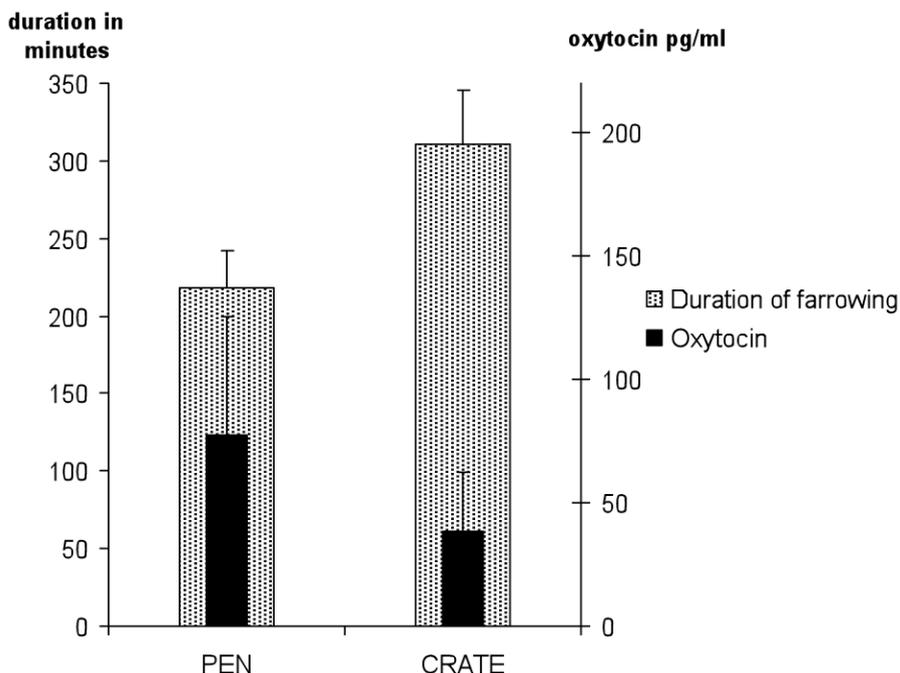


Figura 1. Durata media del parto e media delle oscillazioni di ossitocina post-espulsione in scrofe del gruppo box (n = 9) e gabbia parto (n = 9) di scrofe (media  $\pm$  DS). Dati Oliviero et al., 2008.

Ad oggi abbiamo registrato la durata del parto in diversi studi (Oliviero et al., 2010). Da questi studi è evidente che un parto che dura più di 5 ore è destinato all'insuccesso e porta facilmente a complicazioni sia per la madre e che per i neonati. Pertanto, suggeriamo che nel moderno allevamento delle scrofe, debba essere considerata una soglia di 5 ore per differenziare tra una conclusione favorevole o meno del parto. Diversi fattori, come la costipazione, le condizioni fisiche della scrofa, il numero di parti, la razza e il numero di suinetti nati morti influiscono sulla durata del parto (Oliviero et al., 2010). La stipsi, come discusso in precedenza, può essere risolta aumentando il contenuto di fibra della dieta. Uno spessore di grasso dorsale superiore al 17 mm, inoltre, è considerato anche come un fattore di rischio per un parto prolungato nella linea genetica della scrofa finlandese (Oliviero et al., 2010). Anche il numero di suinetti nati ha prolungato la durata del parto (Oliviero et al., 2010). È noto da studi precedenti che i feti sono ancora vivi poco prima del parto, ma la maggior parte (> 80%) dei suinetti che hanno poche chance di sopravvivere, muoiono durante il corso del parto. È quindi ragionevole supporre che la distocia, se è causata dalla madre o dal feto, sia la causa principale di natimortalità. Secondo Jackson (1972), nelle scrofe, l'inerzia uterina (37%) è da considerarsi come la causa più comune di distocia, seguita da presentazione podalica (14,5%), ostruzione del canale del parto (13%), presentazione contemporanea (10%), torsione verso il basso dell'utero (9%), deviazione verso il basso

della testa (4%) e feto di grandi dimensioni (3,5%). Tuttavia, queste classificazioni non tengono conto di alcune cause delle morti intrapartum di suinetti, come lo strangolamento da cordone ombelicale o le complicanze dovute alla contrazioni uterine. E' ben noto, che i suinetti hanno bisogno di assumere il colostro per acquisire un'adeguata immunità passiva. L'assorbimento del colostro attraverso la parete intestinale dei suinetti può avvenire solo durante i primissimi giorni di vita e la quantità di colostro non aumenta in funzione del numero di suinetti nati. Pertanto, in una nidiata di grandi dimensioni, una supervisione è richiesta, non solo durante il parto, ma anche per verificare che gli ultimi suinetti nati riceveranno un'adeguata quantità di colostro.

### **Performance della scrofa e dei suinetti durante la lattazione**

Un'adeguata quantità di cibo ingerita dalla scrofa è un fattore importante al fine di crescere al meglio i suinetti, soprattutto se la nidiata è numerosa. Un calo nell'assunzione di cibo in prossimità del parto può essere considerato fisiologico. Un graduale aumento dell'assunzione di cibo di 0,5 kg di alimento al giorno fino al giorno 10 circa, è sufficiente per raggiungere l'assunzione giornaliera target di circa 8 kg, pari a circa 100 MJ ME per una scrofa con 12 suinetti da allattare (Peltoniemi e Kemp, 2009). Un aumento troppo veloce della quantità di cibo assunta dopo il parto mette a repentaglio il successo di tutta la lattazione, dal momento che ci sarà un calo di assunzione di cibo, seguito da un'assunzione incostante per la maggior parte della durata della lattazione. E' quindi importante che venga studiato un programma nutrizionale equilibrato, in modo da evitare l'eccessiva perdita di peso durante la lattazione. E' stato dimostrato che alimentare la scrofa con una maggiore quantità di fibra durante la gravidanza, può aumentare l'assunzione di alimento durante la lattazione, con un corrispondente aumento delle performance dei suinetti (Quesnel et al., 2009). E' stato anche dimostrato che l'aumento nell'assunzione di fibra durante la vita riproduttiva della scrofa sembra essere una possibile soluzione, contribuendo al miglioramento del benessere della scrofa, nonché ad una buona capacità riproduttiva della scrofa e a migliorate performance di crescita dei suinetti (Peltoniemi et al., 2009). La mortalità del suinetto e il peso medio alla nascita sembrano essere strettamente associati alla dimensione della nidiata. Quando le dimensioni della nidiata sono aumentate da 10 a 15, il numero di suinetti nati morti è passato da 0,3 a 1,0 e la percentuale di suinetti di peso inferiore a 1 kg è aumentato dal 3 al 15%, rispettivamente (Boulot et al., 2008). In nidiata di grandi dimensioni, è quindi necessaria la supervisione al parto, anche se per fare questo sarebbe necessario conoscere il momento esatto del parto. A tal fine sono state sviluppate tecniche, grazie alle quali la previsione del parto diventa possibile e fattibile. Si possono utilizzare fotosensori che monitorano il parto imminente per prevedere la fase di espulsione nelle 24 ore precedenti la nascita del primo suinetto (Oliviero et al., 2008b). Altre tecnologie moderne, come le termo camere, possono essere utilizzate per individuare i suinetti neonati ipotermici che richiedono un'attenzione immediata da parte del personale. Tuttavia si può obiettare che lo sviluppo attuale di tecniche di gestione del suinetto neonato non sia su basi sostenibili. Invece che avere come target il numero di suinetti nati vivi, le attività di ricerca dovrebbero esser volte all'aumento del peso alla nascita dei suinetti nati e alla diminuzione del tasso di natimortalità. Inoltre, una maggiore attenzione dovrebbe essere posta alla qualità dei suinetti nati, di quelli svezzati e dei suini all'ingrasso. Un migliore qualità dei suinetti e dei suini all'ingrasso potrebbe essere ottenuta con studi a lungo termine, a partire dal periodo fetale, concentrandosi sullo sviluppo precoce del suinetto e, infine, valutando la fase di ingrasso.

### **Gonadotropine e sviluppo follicolare**

La quantità di alimento assunta dalle scrofe durante la lattazione, d'altra parte, è un fattore

chiave per incrementare la secrezione di gonadotropina e lo sviluppo del follicolo durante la lattazione, tuttavia, questi effetti alimentari diventano più evidenti verso la fine della lattazione (Kauffold et al., 2008). La crescita del follicolo dopo lo svezzamento, innescata dalle gonadotropine FSH e LH, si verifica tanto più velocemente quanto migliore è la stimolazione da parte delle gonadotropine prima dello svezzamento (Prunier e Quesnel, 2000; Kauffold et al., 2008). La diminuzione della durata della lattazione è una strategia comunemente adottata in Europa per accelerare il ciclo riproduttivo delle scrofe ad alta produzione e per evitare la perdita eccessiva di peso. Tuttavia, i motivi di sostenibilità ed etica di tali strategie hanno bisogno di un'attenzione approfondita nel prossimo futuro.

Dopo lo svezzamento, i follicoli crescono di circa 1 mm / giorno. Raggiungono la dimensione ovulatoria a circa 7-10 mm entro una settimana dopo lo svezzamento. I risultati più recenti del nostro gruppo suggeriscono che i follicoli ovulanti ad una dimensione di 7 o 8 mm portano a migliori tassi di fertilità e a nidiate più grandi, rispetto a follicoli che ovulano <7 mm o> 8 mm (Vehmas et al., non pubblicato). La tecnologia ad ultrasuoni (US) oggi può essere applicata efficacemente in allevamento per monitorare l'accuratezza del personale addetto all'inseminazione. In scrofaie problema, le inseminazioni vengono eseguite troppo presto o troppo tardi rispetto all'ovulazione. Questo può essere evitato mediante l'applicazione della US. Inoltre possono essere dedotte le soluzioni pertinenti per cambiare la strategia di AI. Il tempo di inseminazione ottimale è stimato tra 0-16 ore prima dell'ovulazione, che avviene approssimativamente quando i due terzi dell'estro in corso sono passati. Lo sviluppo del follicolo può anche essere monitorato con riguardo a possibili aspetti fisiologici e patologici dell'ovaio che non erano stati considerati. L'individuazione dei corpi lutei per indicare estro in lattazione e di follicoli cistici, sono due delle classiche applicazioni della US dopo lo svezzamento.

## CONCLUSIONI

L'esito favorevole del parto è dovuto a diverse componenti: comportamento materno, durata del parto, mortalità dei suinetti e assunzione di colostro. L'alimentazione è considerata come il principale fattore nella gestione riproduttiva della scrofa ad alta prolificità. I nuovi trend prevedono l'aumento della fibra nelle diete per scrofe in gravidanza e soprattutto nel periodo prima del parto, per prevenire la costipazione della scrofa, favorire l'aumento dell'assunzione di acqua in prossimità del parto ed infine per aumentare l'assunzione di latte e le performance dei suinetti. L'utilizzo delle moderne tecnologie per il monitoraggio del parto può diminuire le perdite associate a nidiate di grandi dimensioni. L'uso della tecnologia a ultrasuoni dopo lo svezzamento per monitorare la crescita follicolare può ulteriormente migliorare la dimensione della nidiate. Nei programmi di allevamento, le nuove componenti delle caratteristiche materne come il comportamento materno, la facilità di parto, la produzione di colostro, e i parametri di qualità dei suinetti possono essere adottate per migliorare ulteriormente la percentuale di successo della gestione riproduttiva.

## BIBLIOGRAFIA

Algers B, Uvnäs-Moberg K. (2007). Maternal behavior in pigs. *Horm Behav.* Jun;52(1):78-85. Epub 2007 Apr 1. Review.

Boulot S, Quesnel H, Quiniou N, 2008. Management of High Prolificacy in French Herds: Can We Alleviate Side Effects on Piglet Survival? *Advances in Pork Production* 19; 1-8

Kauffold J, Gottschalk J, Schneider F, Beynon N, Wähler M 2008: Effects on feeding level during lactation on LH and FSH secretion patterns, and follicular development in primiparous sows. *Reprod Dom Anim* 43: 234-238.

Oliviero C., Heinonen, M., Valros A., Hälli O. and Peltoniemi O.A.T. 2008. Effect of the environment on the physiology of the sow during late pregnancy, farrowing and early lactation. *Anim. Reprod. Sci.*, 105(3-4):365-77

Oliviero C, Pastell M, Heinonen M, Heikkonen J, Valros A, Ahokas J, Vainio O and Peltoniemi OAT 2008b Using movement sensors to detect the onset of farrowing. *Biosystems Engineering*, 100: 281-285

Oliviero C, Kokkonen T, Heinonen M, Sankari S and Peltoniemi OAT 2009. Feeding sows with different amount of fibre during late pregnancy, farrowing and early lactation: Impact on the intestinal function, the energy balance and the litter., *Reserch in Veterinary Science* 86(2): 314-9

Oliviero C, Heinonen M, Valros A, Peltoniemi OAT, 2010: Environmental and sow related factors affecting duration of farrowing. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 85-91

Peltoniemi OAT<sup>1\*</sup>, Tast A<sup>2</sup>, Heinonen M<sup>1</sup>, Oravainen J<sup>3</sup>, Munsterhjelm C<sup>1</sup>, Hälli O<sup>1</sup>, Oliviero C<sup>1</sup>, Hämeenoja P<sup>4</sup> and Virolainen JV<sup>2</sup>·2009: Fertility of pregnant sows fed ad libitum with a high fibre diet, *Reproduction in Domestic Animals*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01477.x

Peltoniemi OAT, Kemp B. 2009. Infertility and subfertility in gilts and sows. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, edited by David E. Noakes, Timothy J. Parkinson, Gary C.W. England.. 9 p. Saunders Elsevier, Edinburgh 2009 pp 632-645.

Quesnel H, Meunier-Salaun M-C, Hamard A, Guillimet R, Etienne M, Farmer C, Dourmad J-Y, Pere M-C, 2009. Dietary fiber for pregnant sows: influence for sow physiology and performance during lactation. *J Anim Sci* 87: 532-543

Reiner G, Hertampf B, Richard HF 2009: Postpartales dysgalaktiesyndrom der Sau – eine Übersicht mit besonderer Berücksichtigung der Pathogenese. *Tierärztl Prax* 37 (G): 305-318

**TAVOLA ROTONDA  
RIPRODUZIONE E PERFORMANCE - II**



# DISORDINI RIPRODUTTIVI DI ORIGINE VIRALE NELLA SCROFA

HANS NAUWYNCK

*Laboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University  
Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium  
Email: hans.nauwynck@ugent.be / tel. + 32 9 264 73 73*

La gestazione può essere portata avanti solo mediante (i) un corretto equilibrio ormonale (alta concentrazione di progesterone), (ii) uno scambio di citochine e fattore di crescita locali tra leucociti uterini (soprattutto cellule della linea dei macrofagi e cellule NK), cellule endometriali e macrofagi embrionali / fetali e cellule corioniche, e (iii) una forte soppressione dell'immunità a livello di regione di impianto nell'utero (Arck et al, 2007; Wessels et al, 2007). Al termine della gestazione, quando il feto è pronto per la nascita, inizia a produrre corticosteroidi che a loro volta inducono la produzione di prostaglandine nella placenta (Silver e Fowden, 1989; Burchard et al, 1992). Queste prostaglandine innescano la regressione del corpo luteo inducendo una drastica diminuzione della concentrazione di progesterone. Di conseguenza, i tessuti fibrosi del tratto riproduttivo si ammorbidiscono e la motilità dell'utero viene attivata. Si ritiene che la soppressione immunitaria non venga sostenuta a lungo, con una conseguente risposta nei confronti degli antigeni ereditati dal padre sui tessuti del feto e che la reazione infiammatoria consenta un lento rilascio delle membrane fetali placentari dall'endometrio. Tutti questi cambiamenti terminano con la nascita del suinetto. Ogni deviazione da questa situazione normale può comportare l'interruzione della gravidanza e la morte dell'embrione/feto (Tayade et al., 2007, Wessels et al., 2007).

Le infezioni virali nella scrofa durante la gestazione sono spesso la causa di problemi riproduttivi, caratterizzati da morte embrionale e fetale, ritorno in estro, aborto, parto prematuro o tardivo e nascita di suinetti mummificati, deboli e nati morti. Come i virus inducano questi problemi riproduttivi appare complesso e molto diverso a seconda del virus. Dal momento che molte delle informazioni sulla normale fisiologia / immunologia della gestazione sono ancora mancanti, non è sempre facile trovare spiegazioni adeguate alle patologie riproduttive.

Verrà qui riesaminata la patogenesi dei disordini riproduttivi durante le infezioni virali.

I virus possono influenzare la gestazione in due modi. Possono causare insufficienza riproduttiva in modo indiretto, quando si replicano in aree lontane, ma influenzano la gestazione attraverso fattori legati all'ospite, oppure in modo diretto replicando nel tratto genitale e / o nei tessuti embrionali / fetali.

*Insufficienza riproduttiva indiretta* - Un tipico virus che induce problemi riproduttivi in modo indiretto è il virus dell'influenza suina (SIV). Questo virus si replica a titoli elevati nel tratto respiratorio superiore e innesca una cascata acuta di citochine (Van Reeth et al., 1998). In particolare le citochine pro-infiammatorie interferone-alfa, tumor necrosis factor-alfa e interleuchina 1 raggiungono livelli elevati, inducendo gravi sintomi clinici generali come inattività, anoressia e febbre alta. Durante questa fase, può verificarsi aborto. I feti abortiti non presentano alterazioni cadaveriche ed i tessuti mantengono una consistenza compatta. È generalmente accettato che l'alta concentrazione di citochine pro-infiammatorie causi un veloce crollo del già fragile equilibrio di tolleranza tra madre ed embrione / feto.

*Insufficienza riproduttiva diretta* - Parecchi virus sono in grado di replicare nel tratto riproduttivo e / o nei tessuti embrionali / fetali. I virus a RNA più importanti sono: virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), virus della peste suina classica (PSC), enterovirus suino (PEV) e virus dell'encefalomiocardite suina (EMCV), mentre i principali virus a DNA sono: parvovirus suino (PPV), circovirus suino tipo 2 (PCV2) e virus

della malattia di Aujeszky (ADV). Questi virus possono raggiungere gli embrioni e i feti in due modi: (i) attraverso lo sperma contaminato, durante la monta naturale o l'inseminazione artificiale e / o (ii) attraverso il sangue. I virus che sono escreti attraverso il seme sono: PRRSV, PSC, PPV, PCV2 e ADV (Maes et al, 2008). Il seme contaminato con questi virus può portare all'infezione degli embrioni, provocando morte embrionale e ritorno in estro della scrofa, fatta eccezione per PRRSV. Mateusen et al. (2007) ha dimostrato che lo stato refrattario degli embrioni all'infezione da PRRSV può essere spiegata dall'assenza del recettore sialoadesina. Tutti i virus menzionati provocano viremia e possono attraversare la placenta (Pensaert et al., 2004). A causa della presenza di una solida barriera placentare che non consente a grandi proteine, come gli anticorpi, di attraversarla, è difficile credere che strutture più grandi, come le particelle virali possano farlo. Pertanto, vengono ipotizzati due modalità di attraversamento della placenta: (i) attraverso i leucociti circolanti infetti, che dopo l'adesione alle cellule endoteliali uterine migrano attraverso gli strati della placenta o consentono la diffusione virale da cellula a cellula fino ai tessuti fetali (ADV, PSC, PCV2 ) o (ii) tramite leucociti circolanti che vengono infettati da particelle virali cell-free nel momento in cui aderiscono alle cellule endoteliali della placenta e, successivamente, migrano attraverso gli strati placentari (PRRSV, PPV, PEV, EMCV). Il risultato clinico del passaggio transplacentare del virus per il feto e la scrofa varia notevolmente in relazione a: tipo di virus e titolo virale, stadio dell'infezione e numero di feti che vengono infettati contemporaneamente. La diffusione transplacentare di ADV e di ceppi virulenti di PSC porta ad una rapida diffusione del virus nell'endometrio, nella porzione fetale della placenta e in diversi organi dei feti (Nauwynck et al, 1992; Dewulf et al, 2001). Questo frequentemente porta ad un aborto durante l'intero periodo di gestazione, anche dopo i 70 giorni. I feti non presentano alterazioni apparenti o sono parzialmente mummificati (colorazione marrone). Si possono verificare anche le ulteriori fasi di mummificazione (colorazione nera). I ceppi di CSFV a bassa virulenza possono portare a immunotolleranza nei feti, quando l'infezione si verifica prima dei 70 giorni di gestazione, e ad effetti teratogeni.

Durante la diffusione transplacentare, PCV2, PPV, PEV e EMCV non replicano in misura elevata nel tessuto endometriale e non danneggiano la placenta. Inoltre, i virus si diffondono lentamente ai diversi feti. Questo è il motivo principale per cui questi virus, in generale, non causano aborto nelle scrofe, a meno che il virus non infetti diversi feti contemporaneamente. Il risultato clinico dell'infezione di questi virus nel feto dipende dalla fase di gestazione (Pensaert et al, 2004; Prozeszky et al, 1980; Dunne et al, 1965; Koenen et al, 1994). Prima che il feto possa reagire con una risposta immunitaria ( $\pm$  70 giorni di gestazione;  $\pm$  17cm), le infezioni sono già generalizzate e il feto muore. Superato questo periodo, il feto può difendersi contro il virus. Maggiore è l'età del feto al momento del contagio, migliore è il tasso di sopravvivenza. I problemi si osservano alla nascita: feti mummificati di varie dimensioni, suinetti nati morti e nati deboli. Oltre a questi suinetti, possono nascere anche suinetti normali (non infetti o infetti ma con immunità). Tipiche per PCV2 e EMCV sono la notevole replicazione del virus nei cardiomiociti e le lesioni cardiache (miocardite).

La diffusione transplacentare di PRRSV si verifica principalmente dopo i 70 giorni di gestazione (Christianson et al, 1993; Terpstra et al, 1991), ma il motivo di questo fenomeno non è chiaro. Karniychuk et al. (2009) hanno quantificato i macrofagi che presentavano il recettore sialoadesina di PRRSV e il mediatore di entrata CD163. Entrambe le proteine sono estremamente importanti per la sensibilità del macrofago a PRRSV. A livello della mucosa uterina, è stata rilevata un'elevata concentrazione di cellule doppiamente positive per sialoadesina/CD163 durante l'intero periodo di gestazione. A livello di placenta fetale, sono stati rilevati macrofagi con doppia positività all'inizio e alla fine della gestazione. Tuttavia, nella fase centrale della gestazione i macrofagi presentavano CD163 ma non sialoadesina. Questo tipo di macrofagi è noto per essere refrattario all'infezione, il che spiegherebbe la

manca di una diffusione transplacentare durante la fase centrale della gravidanza. La replicazione di PRRSV è selettiva nei macrofagi di endometrio, placenta fetale e organi del feto, e quindi non porta ad una rapida morte fetale. Poiché si ritiene che i macrofagi uterini rivestano un ruolo nella tolleranza agli antigeni paterni ereditati, è molto probabile che la distruzione di queste cellule possa portare al rigetto del feto. Tale aspetto patogenetico (in corso di studio nel nostro laboratorio) concorda con i sintomi nelle scrofe: aborto tardivo / parto precoce. Si rinvenivano feti parzialmente mummificati e suinetti nati morti con edema.

Di seguito viene riportato un approccio schematico che può essere utilizzato per la diagnosi differenziale dei problemi riproduttivi di origine virale. Dato che, in generale, non tutti i feti sono infetti, è importante analizzare le nidiate intere di diverse scrofe.

A. Principale sintomo rilevato: aborto in diverse fasi della gestazione. Quando i feti sono tutti di aspetto “fresco” e presentano consistenza compatta (rigor mortis), si dovrebbe pensare a quegli agenti patogeni che causano malattie generali, come SIV. La diagnosi deve essere effettuata sulla scrofa (isolamento del virus / PCR su tampone nasale, sieroconversione). Quando la maggior parte dei feti presentano alterazioni post mortali e alcuni feti sono parzialmente mummificati (marrone), si dovrebbe sospettare ADV o PSC. In molti paesi Europei entrambi i virus sono eradicati, quindi la sorveglianza è estremamente importante. Quando è coinvolto ADV sono tipici i focolai necrotici sulla superficie del fegato fetale. La diagnosi dovrebbe essere effettuata in istituti diagnostici veterinari (immunofluorescenza / isolamento del virus / PCR- su polmoni e milza dei feti). È impossibile dimostrare una sieroconversione perché la scrofa ha già sierconvertito al momento dell'aborto.

B. Principale sintomo rilevato: SMEDI - natimortalità, mummificazione alla nascita, morte embrionale e infertilità. Questa sindrome è indicativa di PPV, PCV2 e PEV. Con EMCV il sintomo principale è la natimortalità. In aziende con scrofette e scrofe correttamente vaccinate contro PPV, questo può essere escluso. PCV2 dà problemi solo quando le scrofette provengono da un allevamento con un livello sanitario elevato (sieronegative). Pertanto, devono essere previsti regolari test sierologici delle scrofette. PEV non rappresenta un problema nelle regioni enzootiche. EMCV è molto raro ed è normalmente associato a infestazioni di roditori. La diagnosi può essere fatta mediante (i) isolamento del virus / PCR- su cuore / milza / polmoni da feti mummificati o suinetti nati morti (<17cm) o (ii) determinazione degli anticorpi nei liquidi corporei / siero (> 17cm). Anche per questi virus non è possibile dimostrare una sieroconversione della scrofa perché è già avvenuta prima del parto.

C. Principale sintomo rilevato: aborto tardivo / parto precoce. Questo è un quadro tipico da PRRSV. PRRS può essere diagnosticata mediante isolamento del virus / PCR- da placenta / cordone ombelicale / polmoni / milza di feti parzialmente mummificati / nati morti. Gli anticorpi sono per lo più assenti nei feti e nei suinetti nati morti. I suinetti che sono normali alla nascita possono essere viremici.

# INFERTILITÀ DI ORIGINE NON INFETTIVA, PERDITA DEL PRODOTTO DEL CONCEPIMENTO E MALFORMAZIONI NEI SUINI

FABIO DEL PIERO

*DVM, PhD, Dipl. ACVP, Prof.*

*University of Pennsylvania*

*School of Veterinary Medicine*

*Department of Pathobiology and Dept of Clinical Studies, New Bolton Center*

*Kennett Square – PA – USA*

*fdp@vet.upenn.edu*

**Abstract** . Le perdite del prodotto del concepimento nei suini possono verificarsi in qualunque fase della gestazione da circa 14 giorni dopo la fecondazione, quando ha avuto luogo l’impianto, e durante i 110 giorni di gravidanza. Nonostante la domesticazione, le prestazioni riproduttive delle scrofe mostrano forti tendenze stagionali. Lo stress da calore interrompe l’impianto e diminuisce la sopravvivenza degli embrioni, quindi induce un aumento della percentuale di scrofe che torna in calore durante i mesi estivi. Questa condizione viene definita “infertilità estiva”. Una combinazione di fattori ambientali, nutrizionali e gestionali predispone o contribuisce alla “sindrome dell’aborto autunnale”. Se il metabolismo delle scrofe evolve verso uno stato energetico deficitario o verso uno stato catabolico tale da indurle all’utilizzo dei depositi di grasso corporeo, e forse anche dei muscoli, per mantenere l’equilibrio energetico, è plausibile che i singoli animali possano abortire. La gravidanza richiede una durata costante di luce diurna e una diminuzione della luce può portare a interruzione della gravidanza. La micotossina zearalenone o F2 mima le molecole estrogeniche, e quindi influisce negativamente sulla performance riproduttiva, con inibizione della crescita dell’embrione e del feto. Le scrofe che inalano monossido di carbonio possono generare suinetti abortiti e nati morti, che spesso sono di colore rosso vivo a causa della formazione di carbosiemoglobina nel sangue. L’aborto è stato osservato anche in seguito alla somministrazione di alcuni antibiotici. I difetti congeniti nei suinetti possono derivare da cause alimentari, avvelenamento, e agenti infettivi, inoltre possono verificarsi spontaneamente a causa di anomalie del metabolismo, o possono essere ereditari. Tutti questi difetti possono portare a perdita dell’embrione, aborto, natimortalità, mortalità neonatale, scarti e riforma delle scrofe. Il patologo ha quindi un ruolo fondamentale nell’individuare e comprendere queste perdite.

## INTRODUZIONE

Le perdite del prodotto del concepimento nei suini possono verificarsi durante il periodo dalla fecondazione all’impianto, durante quello di impianto, a circa 14 giorni post-fecondazione fino a 35 giorni, ed infine, durante il periodo di sviluppo fetale, traducendosi in parti prematuri. In sintesi, le perdite possono avvenire in qualsiasi fase della gestazione e sono più evidenti da circa 14 giorni dopo l’accoppiamento, quando ha avuto luogo l’impianto, per i 110 giorni di gravidanza. La perdita precoce del concepito comprende l’espulsione di morula, blastula ed embrione. Il termine “riassorbimento embrionale” viene spesso utilizzato ma è probabilmente fuorviante, dal momento che la mucosa uterina non ha le caratteristiche di una mucosa digestiva e assorbente. Queste perdite gestazionali precoci non vengono solitamente rilevate e non si ha quindi a disposizione il concepito per l’esame diagnostico.

L'aborto è l'espulsione prematura di un feto morto o non vitale. A volte gli aborti sembrano essere più direttamente collegati al controllo materno della gravidanza piuttosto che ad un problema del feto. Per esempio, la presenza del corpo luteo è necessaria per mantenere la gravidanza per tutto il periodo di gestazione. La perdita o la rottura del corpo luteo per qualsiasi causa avvia il processo di parto, e quindi provoca un aborto o, se avviene vicino al termine, un parto prematuro. E' opportuno monitorare di continuo i livelli di aborto in un allevamento. Quando l'interruzione di gravidanza è sospetta, dovrebbero essere registrati tutti i dati, al fine di indagarne meglio la causa: scrofa, numero di parto, verro utilizzato, data della fecondazione e dell'aborto, tipo di stabulazione, tipo e quantità di mangime, storia clinica, sintomi, malattie precedenti, diagnosi precedenti di aborto. Inoltre, deve essere eseguita una necropsia completa del feto, seguita da prove diagnostiche accessorie (istopatologia, immunoistochimica, microbiologia, virologia). L'endometrite può essere una complicanza pericolosa, in qualsiasi fase della gravidanza avvenga la perdita del concepito.

### **Perdite stagionali del concepito: infertilità estiva e sindrome dell'aborto autunnale**

Numerose perdite del concepito (fino al 70%) possono verificarsi a causa di fattori stagionali. Nonostante la domesticazione, la performance riproduttiva della scrofa mostra forti trend stagionali. In natura, la scrofa concepisce una nidata all'anno, partorendo durante la primavera. L'effetto della stagione sulla pubertà nelle scrofette è meno evidente rispetto ad altri aspetti dell'infertilità stagionale. Le scrofette nate durante la primavera e che raggiungono la pubertà durante l'estate presentano l'estro in età più avanzata rispetto alle scrofette nate durante l'autunno, che raggiungono la pubertà in inverno o all'inizio della primavera. Nelle scrofette, l'imaturità del tratto genitale viene rilevata più frequentemente durante il periodo estivo che in altri mesi. Anche nelle scrofe, lo stress da calore compromette l'impianto e diminuisce la sopravvivenza embrionale in estate. Per questo motivo vi è un aumento della percentuale di scrofe che tornano in estro a intervalli regolari (18-24 giorni dopo la fecondazione) e irregolari (25-38 giorni post fecondazione) dopo la fecondazione durante i mesi estivi. Così, il numero di animali che torna in estro dopo la fecondazione aumenta durante o subito dopo l'inizio dell'estate. La perdita di embrioni o feti dopo il rilascio di segnali luteotrofici per il mantenimento della gravidanza (nei giorni 11-13 e 16-20 dopo la fecondazione) comporta sia fenomeni di pseudogavidanza che prolungati periodi aciclici nelle scrofe. Queste scrofe pseudo gravide non partoriscono in autunno e all'inizio dell'inverno. Come risultato delle perdite embrionali e fetali precoci durante il periodo estivo, i successivi tassi di parto da novembre a gennaio risultano notevolmente diminuiti. Una combinazione di fattori ambientali, nutrizionali e gestionali predispone o contribuisce a questa cosiddetta sindrome dell'aborto autunnale. Si pensa che la scarsa assunzione di energia, l'incapacità di mantenere la temperatura ambientale negli impianti di gestazione, quando le temperature scendono drasticamente dopo una giornata di caldo, o i fattori di stress connessi ad ampie e rapide fluttuazioni della temperatura siano coinvolti in questa sindrome di aborto stagionale.

### **Stato catabolico**

Se il metabolismo delle scrofe evolve verso uno stato energetico deficitario o verso uno stato catabolico tale da indurle all'utilizzo delle riserve di grasso corporeo, e forse anche dei muscoli, per mantenere l'equilibrio energetico, è plausibile che i singoli animali possano abortire. Vari fattori possono predisporre a questo stato catabolico compresa la rimozione della lettiera, la scarsa alimentazione, il calo di assunzione di cibo e le sostituzioni di personale. I focolai di aborto si possono verificare quando si passa da un alimento in pellet a una farina, o quando il cibo viene razionato in base al volume e non al peso. Ambienti umidi e bagnati e con correnti d'aria provocano raffreddamento e un aumento delle richieste di energia. Una caratteristica importante degli aborti ambientali è che la scrofa rimane perfettamente normale, spesso

mangia al mattino, e abortisce la nidiata nel pomeriggio. Alcuni chiamano questi fenomeni aborti-parto. I feti abortiti sono perfettamente normali e la scrofa non mostra sintomi di malattia. Il meccanismo alla base di questo fenomeno è la regressione del corpo luteo.

### **Luce**

La gravidanza richiede una durata costante della luce diurna. Idealmente dovrebbe essere di 12-16 ore al giorno. L'intensità della luce percepita dalla scrofa può essere influenzata da una serie di carenze ambientali, come: luci deboli, sporco e polvere sulle lampade, muri alti che circondano gli animali, e alimentatori automatici che fanno ombra alle scrofe.

### **Zearalenone**

Lo Zearalenone o F2 è una micotossina prodotta da *Fusarium graminearum*. Questa micotossina mima le molecole estrogeniche, influenzando la capacità riproduttiva. Si forma più facilmente durante la conservazione del grano, piuttosto che in campo. Le scrofette in età prepuberale sono la categoria più sensibile. Le scrofette e le scrofe mostrano iperemia vulvare ed edema. Vengono di solito osservati anche cicli estrali irregolari e nidiata di dimensioni ridotte. La qualità del seme può essere influenzata con livelli alimentari superiori a 30 ppm, ma la fertilità del verro non viene comunque ridotta. A livelli più alti, possono verificarsi scarsa libido, edema del prepuzio e perdita del pelo. Nelle scrofette prepuberi (1 - 6 mesi), da 1 a 5 ppm nella dieta provocano iperemia vulvare ed edema e sviluppo precoce della ghiandola mammaria e del capezzolo. Prolasso rettale e vaginale possono verificarsi anche nel gruppo degli animali in accrescimento. In scrofette mature, da 1 a 3 ppm possono causare lunghezze variabili del ciclo estrale a causa della ritenzione dei corpi lutei e infertilità. Nelle scrofe, da 5 a 10 ppm possono causare anestro, che può anche essere associato a pseudogvidanza, a causa della ritenzione del corpo luteo. La tossina F2 normalmente non causa aborto, tuttavia, se le scrofe sono esposte durante il periodo di impianto, la dimensione della nidiata può risultare ridotta. I lattonzoli possono sviluppare edema vulvare. Per quanto riguarda l'effetto di F2 sulla gravidanza, la sopravvivenza degli embrioni fino all'impianto non sembra essere interessata se i livelli sono inferiori a 30 ppm, ma oltre questo livello si può verificare perdita del concepito nel periodo tra l'impianto e i trenta giorni di gestazione, seguita da pseudo gravidanze. Bassi livelli, di 3-5 ppm non sembrano influenzare la parte centrale della gravidanza, ma nelle fasi successive la crescita fetale in utero viene depressa, portando alla nascita di suinetti deboli con splay-leg. Alcuni di questi possono anche mostrare edema vulvare. Se vengono ingeriti 60-90 ppm di zearalenone durante i primi 15 giorni post-accoppiamento, si arresta lo sviluppo degli embrioni, che vengono espulsi, e la scrofa spesso non torna in estro per diversi mesi. Per quanto riguarda l'effetto sulla lattazione, da 3 a 5 ppm non hanno alcun effetto. L'intervallo svezzamento-fecondazione può invece risultare prolungato.

### **Avvelenamento da monossido di carbonio**

L'avvelenamento da monossido di carbonio (CO) nei suini si verifica quando vengono utilizzate sistemi di riscaldamento a gas difettosi nei box parto e la ventilazione è scarsa, con un conseguente aumento dei nati morti. Inoltre, la decomposizione delle feci, soprattutto in alloggiamenti con pavimento fessurato, produce elevati livelli di CO. Cinquanta parti per milione di CO non sono rari e suggeriscono una ventilazione insufficiente. Livelli di CO di 250 ppm interferiscono con l'assorbimento di ossigeno da parte dell'emoglobina nel sangue degli animali, compresi i suini e gli esseri umani. Invece di ossiemoglobina, si forma carbossemoglobina e la capacità di trasporto dell'ossigeno nel sangue è ridotta. Questo aumenta notevolmente il numero di suinetti nati morti. I livelli possono raggiungere il 50%. Il monossido di carbonio incide sul rapporto di ossigeno nel sangue dei suinetti nati in modo più rapido che nella scrofa. Le scrofe possono mostrare cianosi e i suinetti nati morti sono spesso di colore rosso a causa

della formazione della carbossiemoglobina nel sangue. Tali livelli di CO possono avere un effetto simile sulle persone, quindi occorre prestare attenzione durante i sopralluoghi in campo.

### **Antimicrobici**

È stato osservato aborto durante l'iniezione di penicillina G - procaina in scrofe gravide. È stato ipotizzato che il rilascio improvviso di quantità tossiche di procaina sia stato responsabile dei segni clinici, come febbre, vomito e brividi. La somministrazione alle scrofe e alle scrofette di mangimi contenenti sulfadimethoxine e ormetoprim in gravidanza avanzata ha aumentato la durata della gestazione e il numero di nati morti e di suinetti deboli.

### **Patologie congenite, comprese malattie ereditarie (genetiche), non infettive**

Le malattie congenite, tra cui quelle ereditarie (genetiche), sono abbastanza comuni nei suini e coprono una serie di condizioni. Il termine "ereditaria" significa che la condizione è stata ereditata dal suinetto attraverso i geni della scrofa o del verro. Il termine "congenito", indica un'anomalia dello sviluppo che si è verificata durante la crescita del feto in utero (ontogenesi), ma non è necessariamente un difetto ereditario la causa. Alcune anomalie di sviluppo non sono evidenti alla nascita (per esempio, un'ernia inguinale), ma solo in una fase successiva della vita e vengono descritte come anomalie di sviluppo a manifestazione ritardata. Se un difetto congenito si verifica frequentemente ed è associato ad una particolare linea o ad una razza, allora è probabile che sia ereditario. Le anomalie nei suinetti possono derivare da cause alimentari, avvelenamento, agenti infettivi, alterato metabolismo, o da difetti ereditari. La maggior parte dei difetti ereditari o congeniti rimane ad una bassa incidenza, perché i programmi di selezione prevedono che gli animali affetti vengano scartati. Talvolta, tuttavia, un verro può essere associato ad una maggiore incidenza di un'anomalia rispetto al solito, per esempio ad ernia ombelicale (questa condizione può essere precipitata da una pressione addominale). La mortalità embrionale varia notevolmente sia tra razze diverse che tra differenti individui e l'ereditarietà gioca un ruolo importante, sebbene non ancora ben definito. Nella maggior parte degli allevamenti, le malformazioni congenite variano da uno 0,5 a un 2,5%, ma, in alcuni casi, i livelli possono raggiungere il 3%. Le cause sono spesso multifattoriali. Un altro tipo di problema che riguarda la nascita è la difficoltà al parto, che è associata ad un bacino piccolo o anormalmente sviluppato.

Di seguito vengono elencate le malformazioni, raggruppate per apparato colpito. Molte di queste malformazioni sono compatibili con la vita e non necessariamente sono legate alla perdita del prodotto del concepimento; ma vengono comunque riportate, dal momento che sono responsabili dello scarto di suinetti e, talvolta, della rimonta dei riproduttori.

L'ernia inguinale e scrotale colpisce soprattutto i maschi, è spesso unilaterale, soprattutto sul lato sinistro. Sembra essere associata a debolezza della tunica vaginale. Le ernie possono essere occasionalmente associate a freemartinismo. L'ernia ombelicale viene riportata meno frequentemente di quella inguinale e può essere un sequela di un'onfalite. Lo pseudoermafroditismo è la condizione in cui un animale nasce con caratteristiche sessuali secondarie o con un fenotipo diversi da quelli che ci si aspetterebbe sulla base del tessuto gonadico (ovaio o testicolo). Lo pseudoermafroditismo maschile è stato osservato sporadicamente e può essere caratterizzato da clitoride penieno, testicoli intraddominali, utero nel maschio e cariotipo XX. La sindrome di infertilità, è un difetto ereditario sterilizzante caratterizzato da spermatozoi a coda corta, descritto in Finlandia in verri Yorkshire. L'annodamento della porzione amniotica del cordone ombelicale è stato sporadicamente osservato, ma le anomalie del cordone ombelicale sono rare nei suini. Le cisti renali di origine ereditaria devono essere differenziate da lesioni simili, ma acquisite; lo stesso vale

per l'idronefrosi.

I capezzoli invertiti sono un comune difetto ereditario. Spesso è interessato solo un capezzolo. Nella condizione clinica denominata splayleg o spraddleleg, gli arti posteriori dei suinetti sono piegati verso l'esterno invece di essere dritti. Questo difetto è associato con ipoplasia miofibrillare dei muscoli deltoide e semitendinoso.

Da uno a quattro suinetti per nidiata possono essere colpiti da questo difetto poligenetico. La artrogriposi è una condizione caratterizzata da contratture articolari multiple. Può essere genetica autosomica recessiva, soprattutto nei suini Yorkshire, o associata a carenze nutrizionali e a teratogeni. Le cause includono: carenza in utero di vitamina A o di manganese, virus della peste suina classica (CSF), steli di tabacco, stramonio (*Datura stramonium*), amarena selvatica (*Prunus serotina*), corteccia e cicuta (*Conium maculatum*). Oltre alla artrogriposi, il deficit di vitamina A causa microftalmia e aplasia del chiasma ottico, che possono anche essere ereditarie o causate dal virus della CSF. I gemelli siamesi sono una rara malformazione ad esito letale.

La iperostosi congenita è una patologia genetica autosomica recessiva, e fatale entro le prime settimane di vita.

La mancanza parziale e totale degli arti (amelia) è stata occasionalmente descritta. Le porfirie sono un gruppo di disordini ereditari o acquisiti di alcuni enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme. Raramente si osservano suinetti con porfiria, caratterizzati da una colorazione rossa delle ossa.

La dermatite giovanile psoriasiforme pustolosa (pitiriasi rosea) è una dermatite ereditaria addominale auto-limitante, benigna prevalentemente osservata nei suini Landrace. L'etiologia è sconosciuta. Le lesioni cutanee iniziali sono caratterizzate da piccole papule eritematose, che rapidamente si estendono a formare un anello (collareto) con bordi distinti, rialzati ed eritematosi. Le lesioni si allargano alla loro periferia, e lesioni adiacenti possono fondersi. La dermatosi vegetans è una malattia ereditaria rara, tipica della Landrace danese. Si presenta come acantosi, ipercheratosi, paracheratosi e dermatite. Spesse croste papillomatose interessano il capo, gli arti, l'addome e i piedi, con pododermatite ipercherotica e polmonite a cellule giganti fatale. La epiteliogenesi imperfetta è stata segnalata in diverse specie animali, e la sua ereditarietà sembra essere di tipo genetico autosomico recessivo. Il termine epiteliogenesi imperfetta è stato utilizzato in casi di epidermolisi bollosa, ma il termine aplasia cutanea congenita (ACC) sembra essere più appropriato per descrivere queste lesioni nei suini. La ACC è gravemente caratterizzata da assenza di epidermide o epitelio della mucosa e colpisce più frequentemente la porzione distale degli arti e la cavità orale. Solitamente viene interessato un solo suinetto per nidiata. La maggior parte dei suinetti colpiti sono maschi, suggerendo un problema legato al sesso. Più della metà dei suinetti presenta lesioni cutanee multiple. La maggior parte delle lesioni sono caratterizzate da assenza di epidermide e di parte del derma e degli annessi. La displasia degli annessi può essere presente anche con, e senza, epiteliogenesi imperfetta. Idrouretere e idronefrosi possono essere lesioni concomitanti. La porpora trombocitopenica è associata a ipersensibilità di tipo II (tipo citotossico). I suinetti muoiono tra 1 e 3 settimane di età per diatesi emorragica. La condizione è predisposta dal trasferimento passivo di anticorpi anti-piastrine e la diagnosi differenziale è una sepsi. Una sindrome simile è stata descritta in minipig Göttingen sessualmente maturi. Questi minipig possono essere colpiti anche da lesioni proliferative e necrotizzanti delle arterie muscolari di piccola e media taglia e delle arteriole in vari organi e tessuti extraparenchimali; i vasi della pelvi renale e le arterie coronarie sono costantemente coinvolti. L'eziopatogenesi delle lesioni vascolari e della sindrome di porpora trombocitopenica è attualmente sconosciuta. La palatoschisi è di origine genetica, ed è stata particolarmente osservata in suini Poland China. Può essere associata ad eventi teratogeni a metà della gestazione.

La persistenza del diverticolo di Meckel nel piccolo intestino è la persistenza

congenita del dotto onfalo mesenterico, ed è la malformazione più frequente del tratto gastrointestinale.

Le cisti congenite biliari possono essere osservate.

L'atresia anale (ano imperforato, atresia di ano e retto) è un difetto genetico, con modalità di trasmissione sconosciute. I dati disponibili possono indicare il coinvolgimento di un determinato verro. È più frequente nei maschi ed è fatale in circa due settimane dato che il retto ha uno sbocco cieco, ed è associato a megacolon secondario. L'incidenza negli allevamenti consolidati è di solito inferiore allo 0,5%, ma può essere molto più alta in allevamenti di scrofette di nuova costituzione.

Per quanto riguarda le anomalie cardiache, un'incidenza relativamente alta di persistenza del forame ovale è stata osservata per le razze Large White e Landrace (15% e 13,4%, rispettivamente). Il difetto del setto ventricolare è più frequente nei maschi. Anche l'ectopia cordis congenita può essere osservata.

L'atresia del colon (atresia coli) si verifica, ma meno frequentemente rispetto all'atresia anale. Nello schistosoma reflexus, i margini laterali del disco somatico dell'embrione in sviluppo si piegano verso l'alto invece che verso il basso. I visceri sono fluttuanti nel sacco amniotico, la testa e la coda sono piegate l'una verso l'altra. E' possibile che si verifichi distocia dovuta al presentarsi nel canale cervicale dei visceri liberamente fluttuanti, o dei quattro arti e della testa insieme. Questa malformazione è stata sporadicamente osservata nei suinetti. Il meningoencefalocele è la protrusione delle meningi e del tessuto cerebrale attraverso un difetto del cranio (cranioschisi). Questa condizione deriva da difetti del tubo neurale causati da danni dell'embrione a 12-14 giorni di gestazione.

La ciclopia (chiamato anche ciclocefalia o sinoftalmia) è una rara forma di oloprosencefalia caratterizzata dal mancata capacità del prosencefalo embrionale di dividere correttamente le orbite degli occhi in due cavità. Questa malformazione è stata osservata molto raramente nei suini, così come la dicefalia. Il patologo ha un ruolo primario per l'individuazione e la comprensione di tutte queste cause e dovrebbe indagare più a fondo anche le cause infettive pure.

## **BIBLIOGRAFIA**

Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N: Pathology of Domestic Animals. 3 Volumes. Fifth edition, 2007, Academic Press Inc.

Bertoldo M, Holyoake PK, Evans G, Grupen CG. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22(8): 1222-9.

Bertoldo M, Grupen CG, Thomson PC, Evans G, Holyoake PK. Identification of sow-specific risk factors for late pregnancy loss during the seasonal infertility period in pigs. *Theriogenology.* 2009 72(3):393-400.

Auvigne V, Leneveu P, Jehannin C, Peltoniemi O, Sallé E. Seasonal infertility in sows: a five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod. *Theriogenology.* 2010 Jul 1;74(1):60-6.

Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1992 8(3): 623-39.

G.W. Almond, W.L. Flowers, S. D'Allaire. Diseases of the Reproductive System. Chapter 6, pp. 113 – 147, in *Diseases of Swine*, 9<sup>th</sup> edition, 2006  
The chapter (#6) is on Diseases of the Reproductive System by Glen W. Almond, William L.

Flowers, Laura Batista and Sylvie D'Allaire (pp. 113-147). The

Tummaruk P, Kesdangakonwut S, Kunavongkrit A. Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. *Theriogenology*. 2009 Jan 15;71(2):369-75.

Tiranti IN, Genghini RN, Gonzalez Quintana H., Wittouc K P. Morphological and karyotypic characterization of intersex pigs with hernia inguinalis. *Journal of Agricultural Science* (2002), 138, 333–340.

Kopp C, Sironen A, Ijäs R, Taponen J, Vilkki J, Sukura A, Andersson M Infertile boars with knobbed and immotile short-tail sperm defects in the Finnish Yorkshire breed. *Reprod Domest Anim*. 2008 43 (6):690-5.

Sukura A, Mäkipää R, Vierula M, Rodriguez-Martinez H, Sundbäck P, Andersson M. Hereditary sterilizing short-tail sperm defect in Finnish Yorkshire boars. *J Vet Diagn Invest*. 2002 14 (5):382-8.

Benoit-Biancamano MO, Drolet R, D'Allaire S. Aplasia cutis congenita (epitheliogenesis imperfecta) in swine: observations from a large breeding herd. *J Vet Diagn Invest*. 2006 18(6):573-9.

Maratea KA, Snyder PW, Stevenson GW. Vascular lesions in nine Göttingen minipigs with thrombocytopenic purpura syndrome. *Vet Pathol*. 2006 43(4):447-54.

Bajan L, Jencik F, Buleca J Jr, Duran A, Teasfaye A, Skalka J Jr, Bugarsky A. Monitoring of foramen ovale patens in different lines of four fattening pig breeds. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 2003. 53. (2-3): 151-155.

# **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

# RICERCHE SUI DEPOSITI VESCICALI NELLE SCROFETTE AL MACELLO

## INVESTIGATIONS ON BLADDER DEPOSITS IN YOUNG SLAUGHTERED SOWS

APICELLA M.<sup>1</sup>, OSELLA E.<sup>1</sup>, GAMBINO F.<sup>1</sup>, MIGLIARDI M.<sup>2</sup>, PETRARULO M.<sup>2</sup>,  
ALBORALI M.<sup>3</sup>, ZANARDI M.G.<sup>3</sup>, SALOGNI C.<sup>3</sup>, BOLLO E.<sup>4</sup>, GUARDA F.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Regione Piemonte, ASL CNI, Saluzzo (CN); <sup>2</sup>A.O. Ordine Mauriziano, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Laboratorio Calcolosi Renali; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia; <sup>4</sup>Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO); <sup>5</sup>Centro di Riferenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Grugliasco, (TO).

**Parole chiave:** scrofa, vescica, depositi

**Key words:** sow, bladder, deposits

**Riassunto.** Nel corso di un'indagine sui depositi presenti nella vescica di scrofette macellate, gli Autori hanno esaminato 860 animali, dell'età di 9 mesi e del peso di 130-170 kg, evidenziando in 46 casi (5,3%) depositi nel lume vescicale, con una percentuale variabile a seconda degli allevamenti dal 3,1 al 6,7. Gli esami batteriologici eseguiti sull'urina hanno consentito di isolare in 4 casi *Proteus* sp., e in 20 casi *E. coli*. Istologicamente si sono rilevati estesi fenomeni atrofici e degenerativo-distrofici della mucosa, fino alla completa scomparsa dell'epitelio vescicale. Gli esami fisico-chimici del sedimento hanno rivelato la presenza di calcite, carbonato-apatite e struvite. Dal punto di vista eziopatogenetico, la formazione di depositi può essere ricondotta a cause strutturali (rete idrica di allevamento insufficiente, elevata competitività per gli abbeveratoi) e/o individuali (difficoltà di deambulazione, caratteristiche genetiche e/o ambientali).

**Abstract.** The authors examined 860 urinary bladders of young sows aged 9 months and weighing 130-170 kg, with the aim to detect the presence of urinary deposits. In 46 animals (5.3%) bladder deposits were detected, with an incidence variable from 3.1% to 6.7% among farms. In 4 samples *Proteus* sp., and in 20 samples *E. coli* were isolated. The histological pattern was represented by atrophy, degeneration and disepithelization of the bladder mucosa. The physico-chemical analysis of the bladder deposits revealed the presence of calcite, carbonate apatite, and struvite. The etiopathogenesis of the lesions may be ascribed to structural deficiencies in the farms and/or individual management and health problems.

### INTRODUZIONE

In una precedente ricerca sulla patologia vescicale delle scrofette regolarmente macellate (Apicella *et al.*, 2010) è stato dimostrata nel 3,4% degli animali la presenza di uroliti e sedimenti di natura purinica. Al fine di determinare l'esatta natura di queste sostanze presenti nella vescica sono state svolte ricerche biochimiche su tali composti per determinare per quanto possibile l'origine e la patogenesi, al fine di impostare una possibile profilassi e terapia negli allevamenti di origine.

### MATERIALI E METODI

Sono stati controllati 860 suini di sesso femminile, dell'età di 9 mesi e del peso di 130-170 kg, macellati in uno stabilimento CEE della provincia di Cuneo. I controlli sono stati effettuati

una volta al mese, nei mesi di aprile, maggio (2 prelievi), giugno, luglio e settembre 2010. I soggetti non presentavano alcun sintomo clinico e appartenevano a quattro allevamenti della provincia di Cuneo, da tempo sotto osservazione.

In particolare, veniva esaminata la vescica; quando si prevedeva all'esame macroscopico esterno la presenza di materiale estraneo, si prelevava l'urina mediante siringa per l'esame batteriologico, previa flambatura della parete. Si eseguiva quindi l'apertura della vescica e il prelievo e l'immediato congelamento di parte del materiale in essa contenuto, per l'esame batteriologico e fisico-chimico. Porzioni della parete vescicale venivano quindi fissate in alcol 70° per l'esame istopatologico, previa macrofotografia. Un'ulteriore porzione della parete veniva fissata in formalina tamponata al 10%.

Gli esami fisico-chimici del sedimento sono stati eseguiti presso il Laboratorio Calcolosi Renali dell'A.O. Ordine Mauriziano di Torino, gli esami batteriologici presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Sezione di Brescia, e gli esami istopatologici presso il Dipartimento di Patologia Animale dell'Università degli Studi di Torino.

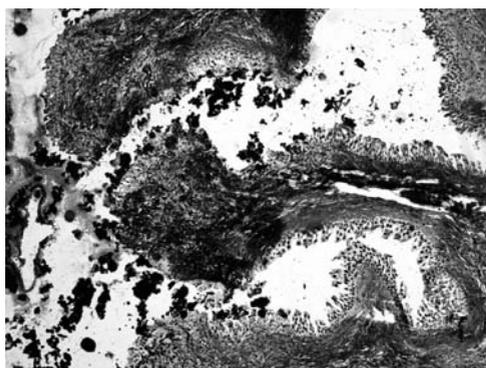
## RISULTATI

In tabella 1 sono sintetizzati i risultati ottenuti nel corso dei controlli mensili. Su un totale di 860 animali esaminati, 46 (5,3%) presentavano depositi nel lume vescicale, con una percentuale variabile a seconda degli allevamenti dal 3,1 al 6,7. Macroscopicamente sulla mucosa vescicale si notava una quantità più o meno abbondante di materiale poltaceo o farinoso, umido, pastoso, di colore giallo-biancastro o grigio-giallastro, che poteva arrivare a ricoprire tutta la superficie interna della parete vescicale. La presenza di veri e propri calcoli di forma sferica, del diametro di circa 1 cm, era presente solo in 4 dei soggetti esaminati.

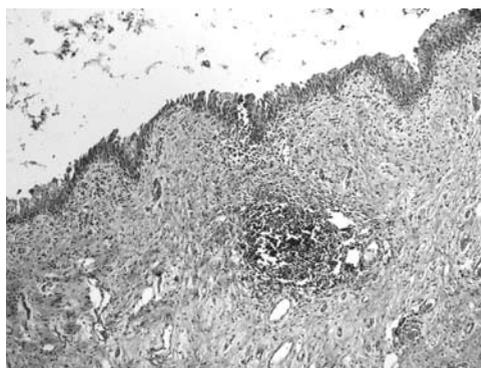
Data	Allevamento # 1		Allevamento # 2		Allevamento # 3		Allevamento # 4	
	Numero di vesciche esaminate	Numero(%) di vesciche con sedimenti	Numero di vesciche esaminate	Numero(%) di vesciche con sedimenti	Numero di vesciche esaminate	Numero (%) di vesciche con sedimenti	Numero di vesciche esaminate	Numero(%) di vesciche con sedimenti
15.04.2010	70	3			72	5		
04.05.2010			58	2			110	6
19.05.2010	62	3			70	4		
02.06.2010			70	2	80	5	70	3
23.09.2010	70	4			60	5	68	4
<b>Totale</b>	<b>202</b>	<b>10 (4,9%)</b>	<b>128</b>	<b>4 (3,1%)</b>	<b>282</b>	<b>19 (6,7%)</b>	<b>248</b>	<b>13 (5,2%)</b>

**Tabella 1.** Numero di vesciche esaminate e numero e percentuale di vesciche con sedimenti.

Istologicamente si osservavano estesi fenomeni atrofici e degenerativo-distrofici della mucosa, con presenza di cellule sfaldate nel lume. In alcuni casi l'epitelio era completamente scomparso. Sulla superficie interna della parete si riscontrava la presenza di materiale amorfo, posto in evidenza mediante colorazione argintica (figura 1). Rari erano i focolai secondari di flogosi nella sottomucosa (figura 2) e nella parete muscolare.



**Figura 1.** *Abbondante presenza di materiale amorfo nel lume vescicale e sulla superficie della muscosa (impregnazione argentea, medio ingr.).*



**Figura 2.** *Focolaio infiammatorio nella sottomucosa della vescica (ematossilina-eosina, medio ingr.).*

Dal punto di vista batteriologico, su 38 esami effettuati, 14 sono risultati negativi, in 4 casi è stato isolato *Proteus* sp., e in 20 casi *E. coli*.

Gli esami fisico-chimici del sedimento urinario hanno permesso di identificare le sostanze indicate in tabella 2.

<i>Composizione fisico-chimica del sedimento</i>	<i>Numero di vesciche</i>
Calcite	10
Carbonato-apatite	4
Struvite	3
<b><i>Totale</i></b>	<b>17</b>

**Tabella 2.** *Composizione fisico-chimica del sedimento.*

In tutti i casi il pH urinario è risultato maggiore di 6,9.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Nel suino la funzione renale presenta alcune differenze rispetto alle altre specie, in quanto la membrana glomerulare è permeabile alle proteine plasmatiche, per cui la proteinuria può essere considerata un reperto fisiologico. Un'ulteriore caratteristica del suino è che il PAI (acido para-aminoippurico) è acetilato a livello epatico e renale (Clement, 2002) per cui non si può eseguirne la clearance come indice della funzionalità del nefrone. Infatti nei lattinzoli la proteinuria è fisiologica ed è massima dopo circa 20 ore dalla nascita.

Nelle scrofe stabulate in gruppo e con acqua a volontà, le urine presentano una concentrazione proteica di 6,2 mg/100 mL, mentre in quelle mantenute in gabbia la concentrazione risulta doppia, cioè di 12,9 mg/100 mL (Loh *et al.*, 1972). La torbidità delle urine può quindi dipendere dalla precipitazione di sali nella vescica, e nel suino è particolarmente frequente il fosfato giallo amorfo.

Secondo Jones (1992), nell'urina si concentrano i prodotti terminali del metabolismo proteico in quantità variabile in funzione del ricambio azotato dell'animale. Quindi la quantità e il tipo di residui organici presenti nell'urina variano in funzione del tipo di alimentazione e del rapporto integrativo esistente con le altre vie di escrezione.

Dal punto di vista anatomico-patologico, si possono classificare i depositi vescicali in tre tipi, cioè sabbia polverulenta, renella e calcoli. La loro composizione varia con la dieta ed è in rapporto agli squilibri metabolici responsabili della loro produzione. Altrettanto numerosi sono i fattori che possono predisporre alla formazione dei depositi del tratto urinario:

- disidratazione e riduzione del volume dell'urina;
- alterazioni fisico-chimiche dell'urina; il pH alcalino, in particolare, favorisce la formazione di calcoli di calcio e magnesio ammonio-fosfati, mentre un pH basico favorisce la formazione di calcoli di ossalato;
- infezioni del tratto urinario, con aumento della concentrazione di ammoniaca;
- carenza di vitamina A.

In bibliografia veterinaria sono segnalati casi di calcoli vescicali nel suino del peso di 1000 g e addirittura di 5450 g (Warburg, cit. da Kitt, 1911, e Joest, 1911), costituiti per lo più da ammonio e magnesio fosfato, oppure di trifosfato e carbonato di calcio. Già nel 1906 Kitt sosteneva che nella vescica dei suini si possono accumulare frequentemente sedimenti caratterizzati da una densa poltiglia sabbiosa bianca o giallastra.

Per quanto riguarda le nostre osservazioni, possiamo rilevare che la percentuale di depositi vescicali rilevati nel corso dell'anno 2010 è aumentata rispetto a quanto rilevato nel 2009, con una variazione dal 3,4% al 5,3%, sempre riferita agli stessi allevamenti. E' inoltre interessante rilevare come la percentuale di sedimenti riscontrati sia pari al 6,6 nel mese di settembre, al 5,6 nel mese di aprile, al 5,0 nel mese di maggio e al 4,5 nel mese di giugno. Questi dati potrebbero essere interpretati come il risultato di un'insufficiente disponibilità di acqua nel periodo estivo quando, per evidenti motivi di termoregolazione, il fabbisogno di acqua è più elevato. Tale insufficienza si ripercuote successivamente a livello urinario nei mesi autunnali, con squilibri metabolici e idrici a livello renale. Dal punto di vista eziopatogenetico, tali squilibri possono essere ascritti a due ordini di cause, strutturali e individuali. Quelle strutturali possono essere ricondotte a una rete idrica di allevamento insufficiente, oppure a un'elevata competitività per gli abbeveratoi da parte delle scrofette. Le cause individuali possono essere rappresentate da difficoltà di deambulazione, oppure a caratteristiche genetiche e/o ambientali.

Per una corretta interpretazione dei risultati fisico-chimici è possibile ipotizzare, riguardo alla presenza di calcite, a lesioni renali. Infatti nell'uomo tale patologia è presente nel cosiddetto "rene a spugna".

Per quanto riguarda la presenza di carbonato-apatite e struvite, si ritiene che il fattore predisponente sia da ricercarsi nell'intervento di germi ureasi-produttori, in grado di provocare un incremento della concentrazione di ammoniaca nelle urine e la precipitazione di sali.

Infine si può ancora osservare che, mediante le indagini fisico-chimiche effettuate nel presente lavoro, non sono stati rilevati residui purinici nei sedimenti vescicali, sebbene in letteratura si faccia frequentemente riferimento a tali sostanze.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Apicella M., Osella E., Gambino F., Alborali L., Zanoni M.G., Salogni C., Bollo E., Guarda F. (2010) "Contributo allo studio delle cistiti subcliniche nelle scrofette al macello" Atti XXXVI Meeting annuale SIPAS, 193-197.
- Clement M.G. (2002) "Il rene" in: Aguggini G., Beghelli V., Clement M.G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R. "Fisiologia degli Animali Domestici con Elementi di Etologia" Torino, UTET, pp. 589-653.
- Joest E. (1911) "Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere" Dresden, Gustav Fischer Verlag.
- Jones J.E.T. (1996) "Apparato urinario" in Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. "Malattie del suino" Padova, Piccin, 51-57.
- Kitt T. (1906) "Pathologische Anatomie der Haustiere, Stuttgart, F. Enke.
- Kitt T. (1911) "Lehrbuch der Pathologischen Anatomie der Haustiere für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin" Stuttgart, F. Enke.
- Loh S.W., Bourne F.J., Curtis J. (1972) "Urine protein levels in the pig" Anim. Prod. 15, 273-283.

# INDAGINE IN CAMPO SULLA DIFFUSIONE DELLA CISTITE DELLA SCROFA

## FIELD SURVEY ON THE DISTRIBUTION OF SOWS CYSTITIS

GRATTAROLA C.<sup>1</sup>, MASSA M.<sup>3</sup>, BELLINO C.<sup>2</sup>, BOTTA E.<sup>3</sup>, DONDO A.<sup>1</sup>, MAGGI E.<sup>2</sup>, MINISCALCO B.<sup>2</sup>, VARNAVA' D.<sup>4</sup>, ZOPPI S.<sup>1</sup>, CAGNASSO A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I.Z.S. Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino;

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino;

<sup>3</sup> Medico Veterinario Libero Professionista, Torino, Scuola di Specializzazione in Patologia Suina di Moretta (CN),

Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino;

<sup>4</sup> Medico Veterinario Libero Professionista, Torino.

**Parole chiave:** cistite, scrofa, allevamento

**Key words:** cystitis, sow, farm

**Riassunto.** Il seguente studio si propone di valutare la presenza della patologia in scrofe di 7 allevamenti siti in provincia di Cuneo e di Torino. Le indagini sono state condotte su 250 scrofe distinte in 4 classi (primipare, in gestazione e in lattazione, e pluripare, in gestazione e lattazione). 57 campioni (22,8%) hanno evidenziato batteriuria significativa.

**Abstract.** The following study aims to assess the presence of the disease in sows of 7 farms sites in the province of Cuneo and Turin. The surveys were conducted on 250 sows divided into 4 classes (primiparous, gestation and lactation, multiparous, gestation and lactation). 57 samples (22,8%) showed significant bacteriuria.

### INTRODUZIONE

Le infezioni del tratto urinario della scrofa (Urinary Tract Infections- UTI) rappresentano una delle principali cause di mortalità e riforma delle scrofe, predisponendo gli animali a infezioni dell'utero gravido e, attraverso l'ambiente, anche a mastiti post-partum. In alcune realtà produttive come quella francese e statunitense sono ritenute sanitarimente ed economicamente rilevanti per le ripercussioni negative sui parametri riproduttivi (bassa prolificità, ritorni in calore, parti languidi, natimortalità eccessiva). L'interesse per le UTI è cresciuto in anni recenti, in concomitanza con l'intensificazione della produzione e l'evoluzione delle conoscenze sulle batteriosi opportunistiche.

Le infezioni si dividono in aspecifiche e specifiche: le prime, localizzate alla vescica, originano essenzialmente dalla contaminazione fecale perineale, per colonizzazione di vagina e uretra da parte di microrganismi di origine enterica, cutanea o ambientale, hanno spesso andamento cronico e raramente presentano sintomatologia evidente; le seconde, più rare e ad evoluzione acuta, con coinvolgimento anche delle alte vie urinarie e dei reni, sono riferibili ad *Actinobaculum suis*, microrganismo commensale del diverticolo prepuziale del verro. (2) Difficile è la quantificazione della reale incidenza della problematica, a causa, soprattutto, delle difficoltà che si incontrano nella diagnosi sugli animali in vita. Ci si è proposti pertanto di mettere a punto e sperimentare protocolli diagnostici in vita per la diagnosi in campo di tali patologie, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti diagnostici ed epidemiologici, e di valutarne la diffusione negli allevamenti suini piemontesi.

E' stato sperimentato un approccio diagnostico basato sull'affiancamento dell'esame

batteriologico qualitativo, mirato alla ricerca della totalità di microrganismi potenzialmente coinvolti, e all'esame batteriologico quantitativo, mirato alla valutazione del ruolo patogeno dei microrganismi aerobi isolati (carica batterica totale- CBT). Al fine di definire i parametri più sensibili per la diagnosi di cistite, sono stati effettuati dei prelievi di urina, comparando i risultati dell'esame fisico-chimico con gli esiti dell'esame batteriologico. Per l'acquisizione di protocolli applicabili in routine sono state messe a punto modalità operative relative a tecniche di prelievo, esecuzione degli esami diagnostici e interpretazione dei risultati, da adattare in base ai risultati conseguiti e ai limiti evidenziati. (1)

## **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.

Le indagini sono state effettuate in allevamenti suinicoli situati nelle due province piemontesi con più elevata densità suinicola (Cuneo e Torino) e con anamnesi relativa a cistiti croniche. Il campionamento è stato effettuato su scrofe in fase di gestazione ed in fase di lattazione. I prelievi di urina sono stati effettuati su 4 classi di animali (primipare, in gestazione (1 G) e in lattazione (1 L), e pluripare, in gestazione (4 G) e in lattazione (4 L)).

E' stato valutato idoneo un numero di campioni complessivo pari a 240, di cui 60 per ognuna delle 4 classi individuate.

Sono state prelevate a random le prime urine del mattino per minzione spontanea da mitto intermedio. I campioni rappresentati da due aliquote di circa 20 ml di urina ciascuna, sono stati raccolti in contenitori sterili per le successive analisi.

L'aliquota destinata all'esame batteriologico è stata stoccata a temperatura di refrigerazione e processata entro 4 ore dal prelievo presso il laboratorio di batteriologia.

La restante aliquote è stata utilizzata per la determinazione dei parametri fisico-chimici effettuata direttamente in allevamento e per l'esame del sedimento, eseguito successivamente presso il Laboratorio.

### Esame fisico-chimico e del sedimento

Per ogni campione prelevato sono stati valutati visivamente i parametri fisici (colore e torpidità) e, con l'utilizzo di test strip (Multistix® 10 SG -Siemens), i parametri biochimici (glucosio, bilirubina, corpi chetonici, pH, sangue, proteine, urobilinogeno, nitriti e leucociti). Presso il Laboratorio del Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino i campioni di urina sono stati centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti, e successivamente è stata misurata la densità del surnatante con metodo refrattometrico; un quantitativo di precipitato pari a circa 0,5 ml è stato risospeso e sottoposto ad esame microscopico per evidenziare eventuali componenti cellulari (RBC-globuli rossi, WBC-leucociti, cellule epiteliali), calcoli, cristalli, batteri ed eventuali contaminanti.

### Esame batteriologico:

Per l'esame batteriologico sull'urina (eseguito presso il Laboratorio di Patologia Animale, Istituto Zooprofilattico, Torino) è stato predisposto un esame qualitativo, basato sull'utilizzo di Columbia Blood Agar, e incubazione simultanea in aerobiosi (per 24 ore), microaerofilia (CO<sub>2</sub> al 5%) (per 24-48 ore) e anaerobiosi (per 48-120 ore), e di Mac Conkey Agar, in aerobiosi (per 24 ore), al fine di rivelare la presenza di tutti i potenziali agenti patogeni coinvolti nelle infezioni urinarie della scrofa, e un esame quantitativo (carica batterica totale- CBT), mirato alla valutazione del ruolo patogeno dei microrganismi aerobi isolati.

Per la determinazione della carica batterica aerobica totale per ml (CBT) si è provveduto a diluire ogni campione di urina in proporzione 1:100; 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 e della quantità seminata, è stata calcolata la carica batterica/ml (UFC/ml).

Come criterio interpretativo la carica è stata considerata significativa in presenza di valori >10<sup>5</sup> (100.000 UFC/ml), di dubbia interpretazione con valori compresi tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup>, mentre valori inferiori a 10<sup>4</sup> sono stati considerati non significativi (riferibili, nel caso di controllo delle urine prelevate in vivo, a contaminazioni di origine esogena (fecale) o flora microbica saprofitica presente in uretra, vestibolo vaginale e vulva).

Si è provveduto all'identificazione delle specie batteriche sviluppatesi in aerobiosi presenti in coltura pura o in numero di colonie >20 per piastra, laddove la carica batterica totale per ml risultava >10<sup>5</sup> o compresa tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup>; per la crescita in microaerofilia e in anaerobiosi si è proceduto all'identificazione delle colonie macroscopicamente non assimilabili a quelle sviluppatesi in condizioni di aerobiosi, indipendentemente dal valore della CBT riscontrata. L'identificazione dei ceppi batterici è stata condotta con l'ausilio di gallerie API miniaturizzate o con sequenziamento con Microseq500<sup>®</sup>, in casi di difficile interpretazione e in caso di sospetta presenza di *Actinobaculum suis*.

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<sup>4</sup>, crescita di flora mista o in numero di colonie < 20 per piastra) o nulla, sono stati considerati negativi.

#### Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software R v 1.8.0. I dati ottenuti sono stati sottoposti a statistica descrittiva ed analitica, al fine di evidenziare la presenza di associazioni significative tra la positività all'esame batteriologico, i parametri fisico-chimici dell'urina e le caratteristiche dell'allevamento. Per la statistica analitica la normalità di distribuzione della popolazione è stata testata con il test di Shapiro Wilk o di Kolmogorov Smirnov dove opportuno. Le variabili numeriche sono state testate con il test t di Student per dati indipendenti, mentre le variabili categoriche sono state testate con il test del  $\chi^2$ . Per tutte le analisi è stato considerato statisticamente significativo un livello di significatività  $\alpha = 0,05$ .

### **RISULTATI**

Sono stati esaminati complessivamente 250 campioni di urina, provenienti da 7 diversi allevamenti.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche degli allevamenti studiati.

CARATTERISTICHE ALLEVAMENTI (N=7)									
CICLO		FECONDAZIONE	MEDIA PARTI SCROFA/ ANNO	PERIODO INTERPARTO MEDIO	MEDIA SUINETTI SVEZZATI/ ANNO	TP/ TV	USO ANTIBIOTICI	PULIZIA SALA GESTAZIONE	
APERTO	CHIUSO	ARTIFICIALE	2,1-2,4	118-154	10,4-11	7 SU 7	7	QUOTIDIANA	5
4	3	7						SALTUARIA	2

**Tab. 1** : Caratteristiche dell'allevamento

**Tab.1** : Features livestock

La distribuzione del campionamento per classi di animali nei 7 allevamenti considerati è stata pari a:

Classe 1° G	Classe 1° L	Classe 4° G	Classe 4° L
66 (26,4%)	49 (19,6%)	75 (30%)	60 (24%)

**Tab 2:** Distribuzione dei campioni per classe selezionata

**Tab. 2:** Breeding: sampling distribution for classes

Dei 250 campioni 57 (22,8%) hanno evidenziato batteriuria significativa, e sono stati pertanto considerati campioni positivi, mentre 193 (77,2%), sterili o con batteriuria non significativa, sono stati considerati negativi; in 44 si è isolata un'unica specie batterica (*E.coli* in 28 casi), in 12 due specie batteriche, e in 1 campione più di due specie batteriche.

Come si può osservare nella tabella successiva sono state svelate essenzialmente infezioni aspecifiche riferibili soprattutto a microrganismi di origine fecale, con netta predominanza coli bacillare.

CAMPIONI POSITIVI	N° (%)	MICROORGANISMO	N°
per 1 specie batterica (isolamento in purezza)	44(77%)	<i>Escherichia coli</i>	28
		<i>Proteus spp</i>	2
		<i>Staphylococcus spp (aureus, simulans, hominis)</i>	3
		<i>Streptococcus spp (suis, dysgalactiae, parasanguinis)</i>	5
		<i>Kokuria rosea</i>	1
		<i>Mannheimia haemolytica</i>	1
		<i>Pasteurella mairii</i>	1
		<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	1
		<i>Enterococcus caecorum</i>	1
		<i>Moraxella spp</i>	1
per 2 specie batteriche	12(21%)	<i>Escherichia coli, Proteus spp</i>	3
		<i>Streptococcus parasanguinis, Corynebacterium striatum</i>	1
		<i>Actinomyces hyovaginalis, Actinobacillus rossii</i>	1
		<i>Escherichia coli, Streptococcus galloliticus</i>	1
		<i>Corynebacterium glucoronolyticum, Kokuria rosea</i>	1
		<i>Escherichia coli, Pseudomonas alcaligenes</i>	1
		<i>Escherichia coli, Streptococcus suis</i>	1
		<i>Escherichia coli, Staphylococcus simulans</i>	2
<i>Escherichia coli, Staphylococcus chromogenes</i>	1		
per più di 2 specie batteriche	1(2%)	<i>Streptococcus dysgalactiae, Mannheimia haemolytica, Staphylococcus xilosus</i>	1
Totale	57		

**Tab.3:** Urine dei capi controllati in allevamento: positività batteriologica

**Tab 3:** Urine of animals in the herd tested: a positive bacteriological

La batteriuria significativa non è risultata indipendente dalla fase del ciclo produttivo: i campioni considerati positivi si sono rivelati infatti significativamente superiori nella fase di lattazione e nella fase di gestazione delle scrofe pluripare ( $\chi^2$   $p < 0,001$ ).

Batteriuria significativa	Classe 1° G	Classe 1 °L	Classe 4°G	Classe 4°L	Totale
NEG	60 (91%)	39 (79%)	58 (77%)	36 (60%)	193 (77%)
POS	6 (9%)	10 (21%)	17 (23%)	24 (40%)	57 (23%)
Totale	66	49	75	60	250

**Tab. 4:** Distribuzione dei campioni positivi per classe selezionata

**Tab. 4:** Distribution of samples positive for the selected class

E' stata osservata una associazione statisticamente significativa fra l'età e la batteriuria nelle scrofe pluripare, indipendentemente dalla fase di produzione. ( $\chi^2$   $p < 0,001$ )

Fase	Es. batteriologico	
	+	-
Pluripare	41	94
Primipare	16	99

#### Correlazione tra positività batteriologica e parametri fisico-chimici

Circa la correlazione tra positività batteriologica e parametri fisico-chimici, è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa fra la batteriuria e la positività ai nitriti e l'emoglobinuria.

#### Correlazione tra positività batteriologica e caratteristiche del sedimento

Circa la correlazione tra positività batteriologica e caratteristiche del sedimento è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa fra batteriuria e presenza di globuli rossi (RBC), presenza di leucociti (WBC), cellule epiteliali, presenza di batteri intracellulari nei leucociti.

### **DISCUSSIONE - CONCLUSIONI**

Le percentuali di affezioni urinarie riscontrate sui soggetti esaminati in vita evidenziano positività nel 22,8% dei casi.

Anche se non è stato possibile rispettare perfettamente lo schema di campionamento prefissato per difficoltà a reperire un numero sufficiente di soggetti della classe 1°L (49 anziché 60), il campionamento effettuato, pari a 250 campioni complessivi, risulta ampiamente rappresentativo e conferma una diffusione elevata della patologia negli allevamenti del nostro territorio, significativamente superiore nei soggetti in fase di lattazione, e in fase di gestazione nelle scrofe pluripare.

I campioni di urina risultati positivi all'esame batteriologico con isolamento di specie batterica unica (in purezza) sono risultati il 77%.

In tutti gli isolamenti in purezza la specie batterica maggiormente isolata è stata *E.coli* (28 su 44), e rilevanti sono risultati i riscontri di batteriuria significativa causata in singolo da microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* (*aureus*, *simulans*, *hominis*), *Streptococcus* (*suis*, *dysgalactiae*, *parasanguinis*), *Enterococcus* (*caecorum*).

Tali riscontri indicano che, nella maggioranza dei casi di cistite evidenziati, gli agenti causali corrispondono a microrganismi responsabili di infezioni aspecifiche, appartenenti a flora endogena e opportunistica tipicamente localizzata nelle basse vie urinarie.

Il riscontro di batteriuria è risultato significativamente associato alla fase produttiva dell'animale indipendentemente dalle caratteristiche dell'allevamento campionato.

Dal punto di vista degli aspetti gestionali, tutte le aziende presentavano standards igienici e di pulizia da considerarsi soddisfacenti. In una sola azienda la quantità di feci presenti nelle gabbie di allevamento è stata considerata non soddisfacente. Tuttavia, in questa azienda veniva praticata la somministrazione preventiva di antibiotici nel periodo peripartale, al fine di prevenire le patologie che frequentemente interessano le scrofe in questa fase produttiva. Questa pratica potrebbe avere influenzato la casistica di positività in quest'ultimo allevamento, che mostrava le caratteristiche sanitarie più scadenti se comparato con gli altri.

I risultati hanno evidenziato un'associazione significativa fra la presenza di batteriuria e l'età degli animali: il maggior numero di campioni positivi è stato riscontrato nelle scrofe pluripare oltre al quarto parto, in particolare in quelle in lattazione, seguite dalle scrofe oltre al quarto parto in gestazione.

Il test rapido utilizzato in campo (cartine Multistix) si è dimostrato di pratico e veloce utilizzo, tuttavia poco sensibile nell'identificare la batteriuria. Gli unici due parametri associati significativamente alla presenza di batteriuria sono stati i nitriti (in 11 campioni su 57) e l'emoglobinuria (in 9 campioni su 57). Tali parametri sono risultati associati in maniera significativa alla positività batteriologica ma con una bassa sensibilità diagnostica. Per quanto concerne la presenza di nitriti, è da considerare che un numero così basso di positività potrebbe essere dovuto al fatto che non tutti i batteri nel loro metabolismo producono nitriti. Un'altra possibile spiegazione ad una così bassa percentuale di positività per questo parametro è che gli animali affetti da cistite tendono ad urinare più frequentemente. La permanenza dell'urina in vescica per un periodo più ridotto di tempo non permetterebbe ai batteri eventualmente presenti di ridurre i nitrati in nitriti in una quantità identificabile dal test da campo.

L'esame microscopico del sedimento si è dimostrato di maggiore utilità diagnostica per l'evidenziazione di batteriuria. I campioni di urina con esame batteriologico positivo dal punto di vista microscopico presentavano ematuria, piuria, presenza di batteri e cellule epiteliali.

La presenza di cellule epiteliali nella maggior parte dei campioni con batteriuria (44 su 57) potrebbe essere imputata ai fenomeni di sfaldamento della mucosa vescicale che si verificano durante i processi infiammatori.

Alla luce dei risultati globali ottenuti si può affermare che:

- l'esecuzione dell'esame batteriologico secondo le modalità adottate, ovvero affiancamento di esame qualitativo e quantitativo, utilizzo di campioni di urina prelevati da mitto intermedio, esame allestito entro 6 h al max dal prelievo, conservazione dei campioni a + 4°C, utilizzo di terreni agarizzati non selettivi (Columbia Blood Agar e McConkey Agar), incubazione simultanea in aerobiosi, microaerofilia e anaerobiosi, prolungata fino a 5 gg, si è dimostrata idonea all'applicazione anche in protocolli diagnostici in routine; è però di fondamentale importanza la disponibilità di metodiche di identificazione batterica avanzate, quali il sequenziamento, da affiancare alle tradizionali metodiche di identificazione biochimica con sistemi miniaturizzati, per consentire agevoli interpretazioni diagnostiche anche in casi di difficile interpretazione (vedi ad esempio *Helicobacter* spp, e in casi di sospetta presenza di patogeni specifici urinari quali *Actinobaculum suis*).

- l'esecuzione dell'esame del sedimento può essere considerata idonea anche in protocolli in routine.

Ai fini applicativi si può suggerire, per uno screening delle cistiti in allevamento

- l'esecuzione di un prelievo dal mitto intermedio di tutti i soggetti a rischio;
- la valutazione macroscopica della torbidità e conseguente selezione dei campioni da sottoporre ad indagini successive;
- l'esame del sedimento di un pool di urina di 10 animali

In caso di riscontro suggestivo di anomalie, sull'urina dei 10 animali del gruppo potrebbe

essere eseguito l'esame batteriologico, preferibilmente in singolo, ove applicabile, per l'individuazione dei soggetti con patologia in atto, richiedendo anche eventuale antibiogramma.

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 microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee, quali ad esempio *E.coli*, che in numerosi casi è stato individuato come unica specie batterica coinvolta. Fondamentale, ai fini di una regolare urinazione, per la prevenzione delle infezioni ascendenti, è senz'altro la disponibilità di acqua ad libitum.

## BIBLIOGRAFIA

1. Biksi I., Takacs N., Vetesi F., Fodor L., Szenci O., Fenyó E. (2002) "Association between endometritis and urocystitis in culled sows", *Acta Veterinaria Hungarica* 50(4), 413-423.
2. Sala V. (2007) "Significato e importanza delle infezioni urinarie della scrofa" *Summa, An. Redd.* 2(3), 43-47.
3. Madeleine Chagnon, Sylvie D'Allaire and Richard Drolet (1991) "A prospective study of sow mortality in breeding herds." *Can J Vet Res* 1991; 55, 180-1847. 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
4. Glen Almond (2005) "An assesment of urinary tract infection in sows."
5. 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
6. 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
7. G. W. Almond, L. G. Simpson, M. S. Nemecek, P. A. Routh (2006) "Urine abnormalities in lactating sows." *Proceedings of the 19<sup>th</sup> IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006 Vol. I*
8. Euzéby, J.P. : *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Actinobaculum, Actinobaculum suis*
9. 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
10. 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.
11. 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.
12. WALKER (R.L.) et MACLACHLAN (N.J.) (1989) Isolation of *Eubacterium suis* from sows with cystitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195, 1104-1107.
13. Groehs Goldberg A.M.(2007) Manual de urinalise suina!da coleta a analise dos resultados- Universidade federal do rio grande do sul , Porto Alegre

# IL LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL) NEL SUINO: DUE TECNICHE A CONFRONTO E NUOVE PROPOSTE PER UN CONCRETO UTILIZZO DI CAMPO

## ***BRONCHOALVEOLAR LAVAGE (BAL) IN SWINE: TWO TECHNIQUES IN COMPARISON AND NEW PROPOSALS FOR CONCRETE FIELD EMPLOYMENT***

SCOLLO, A.<sup>1</sup>, MAZZONI, C.<sup>2</sup>, TONON, F.<sup>2</sup>, BORRI, E.<sup>2</sup>, RAFFI, V.<sup>2</sup>, DONNA, R.<sup>2</sup>, GHERPELLI, M.<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Animali, Università di Padova;*

*[scollo@suiwet.it](mailto:scollo@suiwet.it)*

*<sup>2</sup>Veterinario libero professionista Suiwet.*

**Parole chiave:** Lavaggio broncoalveolare, patogeni respiratori, suino

**Key words:** Bronchoalveolar lavage, respiratory pathogens, swine

**Riassunto.** Scopo del presente lavoro è descrivere e confrontare due tecniche di BAL che non prevedono l'anestesia del soggetto né l'utilizzo di un broncoscopio a fibre ottiche, discutendo gli ambiti più promettenti per l'impiego dell'indagine in condizioni di campo. Sono rientrati nella prova 85 suini, di cui 72 sani all'esame clinico, di ceppo genetico danese e di circa 50 kg/capo di peso medio all'inizio della prova. Gli altri 13 suini, provenienti da altri allevamenti, manifestavano una sindrome respiratoria più o meno intensa. I 72 soggetti sani sono stati sottoposti al BAL in sei giornate di prova, distribuite nell'arco di due mesi. In ogni giornata di prova, su ciascun soggetto sono state praticate due tecniche diverse di BAL: la via nasale e la via orale. I 13 suini con sindrome respiratoria invece sono stati sottoposti ad un unico BAL per via nasale ed a concomitante prelievo di sangue dalla vena giugulare a scopo diagnostico. La via orale è risultata essere decisamente più idonea tra le due tecniche, dimostrandosi agevole per l'operatore e poco invasiva per l'animale. L'isolamento di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2 e virus influenzali con PCR sul BALF suggerisce buone prospettive per l'impiego di campo della tecnica quale metodo di indagine molto sensibile e pratico, che consente un tempestivo monitoraggio dei processi infettivi quando affiancata agli attuali mezzi diagnostici.

**Abstract.** Aim of the study is to describe and compare two BAL techniques without anaesthesia and fiberoptic bronchoscope, discussing the most promising areas of investigation for its use in field conditions. The was carried out in 85 pigs, of which 72 healthy on clinical examination, Danish genetic and average weight about 50 kg/head at the beginning of the trial. The other 13 pigs from other farms, showed a respiratory syndrome. The 72 healthy animals were submitted to BAL in six days, spread into two months. In each test day, each pig have been carried out two different techniques of BAL: the nasal route and the oral route. The 13 pigs with respiratory syndrome instead have been carried out a single BAL by nasal route and concomitant blood collection from the jugular vein for diagnostic purposes. The oral route is found to be better than the nasal route, easier for the operator and less invasive for the animal. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, PCV2 and influenza viruses with PCR on BALF

suggests good prospects for use of BAL in field conditions as a sensitive and practical method of investigation, allowing for rapid monitoring of infectious processes when accompanied with the current diagnosis.

## INTRODUZIONE

Il lavaggio broncoalveolare (BAL) è una procedura di indagine che permette di ottenere materiale (fluido bronco-alveolare) proveniente dalle basse vie respiratorie a scopo diagnostico. Negli ultimi decenni ha acquisito sempre più rilevanza sia in medicina umana che in veterinaria, grazie soprattutto all'avvento della broncoscopia con endoscopio a fibre ottiche che ha permesso una più facile introduzione del catetere nel tratto respiratorio profondo (Ganter and Hensel, 1997).

Il fluido bronco-alveolare ottenuto dal BAL (BALF) è stato oggetto di studi citologici, biochimici e batteriologici nella specie suina, che hanno permesso di descrivere la microflora batterica presente normalmente nel tratto respiratorio (Hensel et al., 1994) e di stabilire dei valori di riferimento per la conta cellulare ottenuta da soggetti sani (Ganter and Hensel, 1997). Ganter et al. (1993) descrivono il BAL come un buon metodo di diagnosi eziologica per le patologie polmonari e diversi autori lo utilizzano per l'isolamento di *Mycoplasma hyopneumoniae* dal polmone (Abiven and Pommier, 1993) e nello studio della risposta immunitaria locale a seguito di vaccinazione per via respiratoria con ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hensel et al., 1996), *Pasteurella multocida* (Kohler et al., 1997) e virus influenzali (Charley et al., 1980). Recentemente, Moorkamp et al. (2008) hanno comparato la presenza dei più comuni agenti batterici nel BALF e nel tessuto polmonare dello stesso animale dopo necropsia, concludendo che il BAL rappresenta un metodo appropriato per l'isolamento dei patogeni respiratori.

Le tecniche utilizzate per il prelievo di materiale dall'albero respiratorio si sono evolute nel tempo. I primi studi sperimentali che prevedevano l'impiego del BAL nel suino risalgono agli anni '70, dapprima effettuati su polmoni isolati dopo la macellazione (Mensik et al., 1971) e pochi anni dopo sugli animali in anestesia mediante inserimento di una cannula per via transtracheale (Williams, 1978). Entrambi questi metodi presentano però seri limiti: nel primo caso, l'impossibilità di seguire l'evoluzione delle infezioni/malattie *in vivo*; nel secondo, l'incisione dei tessuti per avere accesso alla trachea rappresenta sicuramente una tecnica invasiva, difficoltosa e a rischio di contaminazione del campione (Charley et al., 1980). Per questi motivi, a tutt'oggi la tecnica più utilizzata è quella che prevede l'anestesia del suino e l'introduzione per via orale di una sonda tracheale a fibre ottiche (Rudolph et al., 2009). Tuttavia, mentre nelle altre specie di interesse veterinario questa tecnica è ampiamente utilizzata, nel suino il BAL ha trovato impiego quasi esclusivamente in campo sperimentale, sia per la necessità di osservare rigide regole di biosicurezza con un'attrezzatura come il broncoscopio (Moorkamp et al., 2008), sia perché il rischio ed il costo legati all'anestesia dell'animale rendono l'indagine poco proponibile.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere e mettere a confronto due tecniche di BAL che non prevedono l'anestesia del soggetto né l'utilizzo di un broncoscopio a fibre ottiche, grazie all'utilizzo di sonde monouso e all'adozione di manualità semplici e non eccessivamente traumatiche per l'animale. Inoltre, sulla base delle prime esperienze maturate dagli autori, si discutono gli ambiti più promettenti per l'impiego del BAL in condizioni di campo, con l'obiettivo di integrare e migliorare gli attuali mezzi di indagine delle infezioni/malattie respiratorie, che sempre più richiedono strategie di prevenzione e tempestività di diagnosi per consentire l'abbattimento dei costi sanitari.

## **MATERIALI E METODI**

Sono rientrati nella prova 85 suini appartenenti a differenti condizioni di campo. Settantadue soggetti provenienti da un unico allevamento risultavano sani all'esame clinico, erano di ceppo genetico danese e di circa 50 kg/capo di peso medio all'inizio della prova. Gli altri 13 suini invece, provenienti da altri allevamenti, manifestavano una sindrome respiratoria più o meno intensa. Tre di loro, di ceppo genetico olandese, si trovavano nello stesso sito di ingrasso e pesavano circa 80 kg/capo, mentre i restanti 10 erano scrofette in accrescimento (5 di ceppo genetico olandese e 5 di ceppo genetico inglese) provenienti da 2 nuclei di moltiplicazione. I 72 soggetti sani sono stati sottoposti al BAL da quattro operatori in sei diverse giornate di prova, distribuite nell'arco di due mesi ad intervalli di circa 10 giorni l'una dall'altra. In ogni giornata di prova, su ciascun soggetto sono state praticate due tecniche diverse di BAL: la via nasale (Abiven and Pommier, 1993) e la via orale (Marchant and Muller, comunicazione personale, 2010). L'ultima giornata di prova è stata effettuata ad un peso medio degli animali di circa 80 kg/capo. I 13 suini con sindrome respiratoria invece sono stati sottoposti ad un unico BAL per via nasale ed a concomitante prelievo di sangue dalla vena giugulare a scopo diagnostico.

### **Tecniche di lavaggio broncoalveolare**

Entrambe le tecniche di BAL sono state effettuate sugli animali *in vivo* senza l'ausilio di alcuna anestesia (Figure 1-2). Il mezzo di contenzione utilizzato è stato un torcinaso serrato attorno alla mascella il più caudalmente possibile. L'estremità libera del torcinaso è stata fissata ad un gancio in posizione sopraelevata in modo da ottenere un'estensione moderata del collo dell'animale, la cui testa è stata mantenuta allineata con l'asse del corpo.

#### *Accesso al polmone per via nasale*

È stato utilizzato per il prelievo un catetere di 90 cm di lunghezza e 1,9 mm di diametro (Compipath® Vétérinaire). Dopo la pulizia del grugno, il catetere è stato introdotto in una delle due narici mantenendolo il più medialmente possibile lungo il setto nasale e introducendolo in profondità ad ogni atto inspiratorio dell'animale per facilitarne l'entrata in trachea. La sonda è stata bloccata alla comparsa della tosse, che ne ha indicato l'arrivo nelle vie aeree profonde. La prova dell'entrata in trachea era rappresentata dall'appannamento del catetere durante gli atti respiratori.

#### *Accesso al polmone per via orale*

Per mantenere aperta la bocca dell'animale è stato utilizzato un apribocca convenzionale. Si è fatto uso di due cateteri: una guida sterile della lunghezza di 53 cm (Unomedical®) ed un catetere sonda più lungo e sottile, della lunghezza di 90 cm e di 1,9 mm di diametro (Compipath® Vétérinaire). Dopo l'apertura della bocca, il catetere guida è stato inserito per la sua intera lunghezza in cavità orale lungo il rafe mediano del palato duro, mantenendolo il più dorsale possibile e parallelo all'asse dell'animale per facilitarne l'entrata in trachea. La sua introduzione in profondità è avvenuta durante gli atti inspiratori. La seconda sonda è stata quindi inserita all'interno della guida, che ne ha permesso un facile superamento della laringe. La sonda è stata bloccata alla comparsa della tosse, che ne ha indicato l'arrivo nelle vie aeree profonde. La prova dell'entrata in trachea era rappresentata dal cambio del timbro di voce dell'animale al passaggio della sonda guida attraverso la laringe e dall'appannamento del catetere durante gli atti respiratori.

**Figura 1.** BAL per via nasale (a sinistra) e per via orale (a destra).  
**Figure 1.** BAL by nasal route (on the left) and by oral route (on the right).

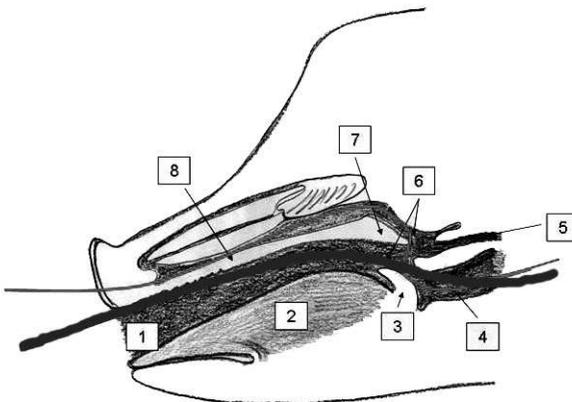


In entrambe le tecniche, dopo il raggiungimento delle vie aeree profonde è stata collegata al catetere una siringa sterile da 20 ml contenente 15 ml di soluzione fisiologica isotonica sterile e l'equivalente di 5 mL di aria. L'iniezione dell'aria avveniva immediatamente dopo il rapido inserimento della soluzione fisiologica all'interno del polmone, allo scopo di svuotare il catetere ed avere la certezza di aspirare liquido venuto a contatto con il parenchima respiratorio. È seguita una immediata aspirazione di 2-5 mL di BALF con suo stoccaggio in provette sterili. In caso di difficoltà di recupero del BALF dal polmone si è provveduto ad una nuova iniezione di 10 mL di soluzione fisiologica sterile attraverso il catetere, ripetendo poi l'operazione di aspirazione.

**Figura 2.** Sezione sagittale destra della testa di suino. Percorso del catetere per via nasale (linea rossa) e per via orale (linea blu).

1 Cavità orale; 2 Lingua; 3 Epiglottide; 4 Cavità laringea; 5 Esofago; 6 Cavità faringea; 7 Palato molle; 8 Palato duro.

**Figure 2.** Right sagittal plane of pig head. Nasal route (red line) and oral route (blue line).  
 1 Oral cavity; 2 Tongue; 3 Epiglottis; 4 Larynx cavity; 5 Esophagus; 6 Pharynx cavity; 7 Soft palate; 8 Hard palate.



## **Analisi di laboratorio**

Il BALF ed il siero ottenuti dai 13 suini con sindrome respiratoria sono stati sottoposti, sotto forma di due rispettivi pool per ciascuna azienda, alla ricerca mediante PCR di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2, virus influenzali (H1N1 e H3N2) e virus della malattia di Aujeszky. Inoltre su tutti i campioni di BALF è stato effettuato un esame batteriologico.

## **RISULTATI**

### **Tecniche di lavaggio broncoalveolare**

In nessuno dei circa 900 prelievi effettuati nel corso della prova si sono osservate nei suini reazioni indesiderate, a partire dalla morte per arrivare a stati di choc a seguito della manualità di preparazione dei soggetti e di esecuzione del prelievo. In cinque casi si è riscontrata la presenza di emazie nel BALF, senza peraltro poter registrare in seguito alcun segnale di malessere negli animali.

#### *Accesso al polmone per via nasale*

Il BAL eseguito per via nasale ha richiesto la manualità di un unico operatore e di un solo catetere. Il tempo impiegato per ciascun prelievo è stato di 5-15 minuti a seconda dell'indole del suino, compreso il tempo necessario al contenimento dell'animale. Il percorso della sonda lungo l'intero tratto respiratorio esterno ha frequentemente provocato negli animali lievi reazioni di intolleranza come starnuti, colpi di tosse, spostamenti della testa e lacrimazione oculare. Con altrettanta frequenza, a seguito di starnuti e colpi di tosse il catetere si è piegato all'interno delle vie nasali ostruendosi e rendendo vano il tentativo di prelievo. Inoltre, gli operatori hanno riportato all'unanimità una maggior difficoltà nell'effettuare il prelievo nei 72 suini di ceppo genetico danese durante la prima metà del ciclo di ingrasso. Il catetere infatti entrava spesso in esofago piuttosto che in trachea, rendendo impossibile il prelievo del BALF. In questi soggetti, nessun prelievo effettuato all'inizio del ciclo di ingrasso (circa 50 kg/pv) ha avuto esito positivo al primo tentativo. Tale difficoltà si è risolta gradualmente con l'aumentare del peso degli animali mentre si è verificata solo sporadicamente nei restanti 13 animali di diverso ceppo genetico. Una panoramica sulle principali caratteristiche della tecnica del BAL per via nasale è illustrata nella Tabella 1.

#### *Accesso al polmone per via orale*

Il BAL eseguito per via orale ha richiesto la manualità di due operatori e di due cateteri. Il tempo impiegato per ciascun prelievo è stato di 5-15 minuti a seconda dell'indole del suino, compreso il tempo necessario al contenimento dell'animale. Non si sono verificate reazioni di intolleranza al passaggio del catetere attraverso le vie respiratorie, tranne sporadici colpi di tosse al superamento della laringe, ed entrambe le sonde hanno mostrato ostruzioni da piegamento solo saltuariamente. Inoltre, tutti gli operatori hanno riportato una notevole facilità nell'esecuzione del prelievo anche prima di acquisire una buona manualità dovuta all'esperienza indipendentemente dal ceppo genetico e dal peso dei suini testati. Una panoramica sulle principali caratteristiche della tecnica del BAL per via orale è illustrata nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Caratteristiche del BAL per via nasale e per via orale a confronto.  
**Table 1.** Comparison of BAL characteristics from nasal route and oral route.

		Via nasale	Via orale		
PRO		Minore impiego di manodopera: 1 operatore.	Maggiore impiego di manodopera: 2 operatori.	CONTRO	
		Minore impiego di materiale: 1 catetere.	Maggiore impiego di materiale: 2 cateteri, 1 apribocca.		
CONTRO		Frequenti lievi reazioni di intolleranza al passaggio del catetere nell'intero tratto respiratorio esterno: starnuti, colpi di tosse, spostamenti della testa e lacrimazione oculare.	Sporadici colpi di tosse al passaggio del catetere attraverso la laringe.	PRO	
		Frequente ostruzione del catetere per piegamento.	Rara ostruzione per piegamento di entrambi i cateteri.		
		Elevata difficoltà di riuscita in suini di genetica danese di giovane età.	Elevata facilità di riuscita in tutte le genetiche ed a tutte le età.		

#### Analisi di laboratorio

I risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio dei pool di BALF e siero provenienti dai 13 suini con sindrome respiratoria sono riportati in Tabella 2. Nei pool dell'azienda A e B si è verificata una discordanza tra i risultati ottenuti dall'analisi del BALF (positivo) e del siero (negativo) per quanto riguarda la ricerca di PRRSv.

**Tabella 2.** Risultati delle analisi di laboratorio ottenute con PCR su BALF e siero e con esame batteriologico su BALF.

**Table 2.** Results of lab analysis obtained from PCR on BALF and serum and from bacteriologic exam on BALF.

Azienda	Unità	Prelievo	N° campioni	M. Hyo.	PRRS	PCV2	Influenza	Aujesky	Batteriologico
A	Ingrasso	BALF	3	Pos.	<b>Pos.</b>	-	-	-	Gen. <i>Streptococcus</i>
		Siero	3	-	<b>Neg.</b>	Neg.	-	-	
B	Scrofaia	BALF	5	Pos.	<b>Pos.</b>	Neg.	Pos.	Neg	<i>Pasteurella multocida</i>
		Siero	5	-	<b>Neg.</b>	Neg.	-	-	
C	Scrofaia	BALF	5	Pos.	Neg.	1100 copie	Neg.	Neg.	Neg.
		Siero	5	-	Neg.	15000 copie	-	-	

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti, il BAL effettuato nell'animale non anestetizzato e senza l'ausilio di un broncoscopio a fibre ottiche è una tecnica di indagine che si presenta economica, agevole per l'operatore e poco invasiva per l'animale. L'assenza di apparenti stati reattivi o di sofferenza nei suini già nell'immediato post-prelievo conferma quanto riscontrato da Abiven e Pommier (1993), che all'autopsia a seguito di BAL non trovarono alcuna lesione alle vie respiratorie. Inoltre, l'utilizzo di cateteri monouso consente di praticare le buone norme di biosicurezza sempre più indispensabili nel settore suinicolo.

Sebbene il BAL sia un prelievo molto localizzato e potenzialmente non rappresentativo dell'intero polmone (Reinhold et al., 2005), Moorkamp et al. (2008) affermano che un esame batteriologico ottenuto dal BALF, proveniente per lo più da un lobo polmonare caudale, è comparabile alle analisi del tessuto polmonare *in toto* e di tamponi bronchiali prelevati dai lobi craniali e medi con il grande vantaggio di poter essere eseguito sull'animale *in vivo*.

Entrambe le tecniche, quella per via nasale e quella per via orale, si sono dimostrate facilmente praticabili in campo, ma la via orale è risultata essere decisamente più idonea in talune condizioni. Malgrado necessità di maggior personale e di più materiale, non ha presentato infatti alcuna limitazione legata alla conformazione anatomica delle diverse linee genetiche o alla differente età degli animali. Al contrario, la via nasale è risultata essere di difficile approccio nei suini di ceppo genetico danese tra i 50-70 kg circa, nei quali la sonda si dirigeva con molta più probabilità verso l'esofago piuttosto che verso la trachea. È possibile che esistano lievi differenze anatomiche tra una linea genetica e l'altra che rendono il tragitto compreso tra le narici e la trachea meno lineare ed accessibile nei suini di questa linea genetica. Si ipotizza che ad ostacolare la sonda a livello di laringe possano essere una diversa conformazione della cartilagine aritenoidea od una maggiore estensione del palato molle.

Le analisi di laboratorio sul BALF tramite PCR hanno consentito l'isolamento di *Mycoplasma Hyopneumoniae*, PRRSv, PCV2 e virus influenzali. In due casi, i risultati ottenuti dalle diverse matrici biologiche dello stesso animale sono risultati discordanti, indicando una positività al PRRSv per il BALF ed una negatività per il siero. Tale risultato può fornire delle informazioni temporali sul processo infettivo eventualmente in atto, rilevanti sia dal punto di vista epidemiologico che clinico. Uno studio recente nell'uomo (Gidaris et al., 2010) suggerisce l'utilizzo del BAL per la diagnosi precoce di flogosi respiratoria tramite la misurazione dei valori leucocitari e di quelli di alcune citochine presenti nel BALF. Nelle condizioni di campo dell'allevamento suinicolo, il confronto e l'interpretazione dei risultati ottenuti dal BALF e dal siero provenienti dagli stessi animali potrebbe consentire di monitorare il processo infettivo con informazioni epidemiologiche di grande tempestività.

La comparazione tra le due matrici biologiche (BALF e siero) potrebbe fornire, almeno in alcune importanti malattie respiratorie del suino, informazioni diagnostiche più complete e tempestive, consentendo, nei casi in cui non fossero disponibili polmoni da cadaveri o da animali sacrificati, di evitare un secondo controllo sierologico in fase convalescente, abbreviando così i tempi di intervento terapeutico mirato.

La eventuale maggior sensibilità del BALF rispetto al siero nei confronti di PRRSv (da valutare in futuro su un campione più vasto) o la sua capacità di evidenziare il virus nelle vie respiratorie anche dopo la fine della fase viremica, potrebbe modificare l'approccio manageriale riguardo all'introduzione della rimonta nei siti di riproduzione.

Dai dati di laboratorio disponibili sinora si evidenzia una costante positività del BALF per *Mycoplasma Hyopneumoniae*. L'individuazione del microrganismo *in vivo* è generalmente effettuata tramite PCR su tamponi nasali, ma studi sperimentali suggeriscono che i siti di campionamento ottimali si trovano nelle parti più profonde del tratto respiratorio (Fablet, 2011). Il BAL potrebbe dunque rappresentare un metodo di indagine molto sensibile e pratico da affiancare agli attuali mezzi diagnostici.

## **BIBLIOGRAFIA**

ABIVEN P., POMMIER P. (1993) Technique de lavage tracheobronchique par voie transnasale pour la detection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié. *Veterinary Research* 24, 515–522.

CHARLEY B., FRENOVE B. & VILLIERS P. (1980) Description et efficacité d'une méthode modifiée de lavage pulmonaire chez le porc anaesthésié. *Annual de la Recherche Veterinaire* 11, 209-213.

FABLET C., MAROIS C., DORENLOR V., EONO F., EVENO E., POEZEVARA T., KOBISCH M., MADEC F., ROSE N., 2011. Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant. *JRP* 2011, in pressing.

GANTER M., HENSEL A. (1997) Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. *Research in Veterinary Science* 1997, 63, 215-217.

GANTER M., KIPPER S., SCHOTTGER-WEGENER H., BECKMANN G. & BUNKA S. (1993) Diagnosis of pneumonitis in living pigs by bronchoalveolar lavage. *Berliner & Munchner Tierarztliche Wochenschrift* 1116, 330-333.

GIDARIS D., KANAKOUDI - TSAKALIDOU F., PAPAKOSTA D., TZIMOULI V., TAPARKOU A., VENTOURI M., TSANAKAS I., 2010. Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non inflammatory lung disease. *Hippokratia* 2010, 14, 2: 109-114.

HENSEL A., GANTER M., KIPPER S., KREHON S., WITTENBRINK M. M. & PETZOLD K. (1994) Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1697-1702.

HENSEL A., VAN LEENGOED L. A. M. G., SZOSTAK M., WINDT H., WEISSENBOCK J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., KATINGER A., STADLER M., GANTER M., BUNKA S., PABST R. & LUBITZ W. (1996) Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *Journal of Biotechnology* 44, 171-181.

KOHLER H., LEMSER B., MULLER G., SAALMULLER A. (1997) Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58 (1997) 277-286.

MARCHANT D., MULLER V., 2010. Tecnica di Lavaggio Bronco Alveolare per via orale. *Clinique Reseau Cristal*, comunicazione personale.

MENSIK J., FRANZ J., POSPISIL Z., KREJCI J. (1971) The local role of antibodies in the protection of calves and piglets against viral respiratory infections. *Acta Vet., suppl.* 2, 75-81.

MOORKAMP L., NATHUES H., SPERGSER J., TEGELER R., GROSSE BEILAGE E. (2008) Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *The Veterinary Journal* 175, 273–275.

REINHOLD P., COSTABEL U., HAMACHER J., THEEGARTEN D., GANTER M., ROSENBRUCH M., 2005. Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier. *Pneumologie* 59, 485–501.

RUDOLPH A., MARKSTALLER K., GAST K. K., DAVID M., SCHREIBER W. G. and EBERLE B. (2009) Visualization of alveolar recruitment in a porcine model of unilateral lung lavage using <sup>3</sup>He-MRI. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53: 1310–1316.

WILLIAMS P.P., (1978) Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy - derived pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 485-489.

# COSA È IL “*BUNGA BUNGA*”, E PERCHÉ È COSÌ IMPORTANTE PER GLI ALLEVATORI DI SUINI ITALIANI

## WHAT IS “*BUNGA BUNGA*”, AND WHY IS SO IMPORTANT FOR THE ITALIAN PIG PRODUCERS

GIUSEPPE BARICCO

Medico Veterinario Libero Professionista, TORINO [giuseppe@baricco.it](mailto:giuseppe@baricco.it)

**Parole chiave:** diossina, informazioni, giornali, TV

**Key words:** dioxin, informations, newspapers, TV

**Riassunto.** Lo “scandalo” tedesco della contaminazione – attraverso i mangimi – di uova e carni suine ha visto immediato ed ampio riscontro sulle pagine dei giornali e sui notiziari TV. Pochi giorni dopo un altro scandalo, definito “bunga bunga” ha distratto l’attenzione dei media italiani da un tipo di tematica suinicola ad un’altra. L’articolo esamina lo svolgimento puntuale dei fatti, l’interpretazione e la spiegazione datane sulla stampa italiana, e l’effetto dell’irrompere della vicenda “bunga bunga” sulla prospettiva dell’andamento del mercato italiano del suino da macello rispetto al mercato tedesco, privo di “bunga bunga”.

**Summary.** The German dioxin “scandal” on the contamination – through the feeds – of eggs and pork meats has been widely and promptly reported on newspapers and TV. Few days after, another occurring scandal, named “bunga bunga”, has moved the interest of the Italian media from one swine theme to another one. The article shows the exact course of events, the interpretations and explanations provided from the Italian press, and the effect of the incoming “bunga bunga” story on the perspectives of the swine market trends, compared to the German situation, “bunga bunga” deprived.

### INTRODUZIONE

Il riscontro economico delle attività di produzione animale nei tempi moderni è sempre più influenzato – oltre che dalla dinamica della richiesta/offerta tipica del mercato – anche dalle informazioni relative, che giungono ai consumatori attraverso il filtro dei mezzi di comunicazione di massa.

In particolare il comparto degli allevamenti cosiddetti “intensivi” non gode di buona stampa, ed in ogni occasione possibile viene additato ai consumatori come potenziale fonte di pericolo, vuoi per la salute degli umani, vuoi per la conservazione dell’ambiente.

Particolarmente ipercinetici in questa opera di divulgazione in negativo delle attività di allevamento sono da un lato i circoli del vegetarianesimo militante, i quali svolgono una forma attiva di apostolato per convincere anche i normoalimentati a sposare le loro tesi etiche e nutrizionali, dall’altro i fautori di un ritorno alla agricoltura preindustriale a *prescindere*, quasi sempre animati da dosi difficilmente digeribili di radicalismo *caviar chic*.

Un recente episodio di contaminazione da diossina di mangimi avvenuto in Germania (con rischio conseguente di inquinamento di alcuni lotti di prodotti di origine animale, carni suine incluse) ha nuovamente dato il via a comunicazioni di stampa volte ad una informazione “colpevolizzante” il sistema degli allevamenti: in Italia, per grande fortuna degli allevatori di suini, pochi giorni dopo la comparsa di queste notizie si è presentato sulla scena un nuovo campo di interesse per il sistema dei *media*, sempre attinente al maiale, e cioè il cosiddetto “scandalo bunga bunga”.

Nel corso del presente articolo si esaminerà lo svolgimento puntuale dei fatti, l'interpretazione e la spiegazione datane sulla stampa italiana, e si valuterà l'effetto dell'irrompere della vicenda "bunga bunga" sulla prospettiva dell'andamento del mercato italiano del suino da macello.

## **MATERIALI E METODI**

### Svolgimento dei fatti

Quella che segue è la traduzione riassunta della nota informativa di sintesi sulla vicenda, come pubblicata nella sezione "food" del sito della Comunità Europea il giorno 24 gennaio 2011: ([http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxin\\_germany\\_information\\_note\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxin_germany_information_note_en.pdf)). Ogni aggiunta esplicitiva al testo originale viene riportata in corsivo citando la fonte quando pertinente.

- Presso un produttore di grassi (*Harles & Jentzsch, Uersten, DE*) prodotti destinati alla immissione nei mangimi sono stati miscelati con acidi grassi destinati ad uso tecnico (*i.e.: industriale, si usano nell'industria della carta*) e non alimentare *alla fine del 2010*. Questi acidi grassi erano contaminati con diossina.
- I lotti di acidi grassi per uso tecnico provenivano da una Società produttrice di biodiesel in Germania. Sette lotti di acidi grassi sono stati consegnati dal produttore di biodiesel per il tramite di un commerciante olandese: tre di questi lotti, consegnati nel Novembre 2010, furono trovati contaminati, gli altri quattro lotti, consegnati nel Dicembre 2010, non erano contaminati. La fonte della contaminazione non è attualmente chiara.
- *La Ditta di biodiesel è la Petrotec AG, la quale vendeva i propri acidi grassi tecnici alla Ditta olandese Olivet s.a., la quale li rivendeva alla Ditta tedesca Harles & Jentzsch. Successive indagini ufficiali hanno appurato che sui documenti di vendita della Petrotec e della Olivet era chiaramente indicata la destinazione tecnica ed il divieto di impiego nei mangimi delle merci in questione (Rapid Alert System for Feed and Food, European Commission, Health & Consumer Directorate E – Safety of the food chain, Nota del 7 Gennaio 2011, at [http://www.pve.nl/wdocs/dbedrijfsnet/up1/ZgkhywjIgjB\\_RASFF\\_1771-add09.pdf](http://www.pve.nl/wdocs/dbedrijfsnet/up1/ZgkhywjIgjB_RASFF_1771-add09.pdf))*
- In via precauzionale tutti i lotti di grasso prodotti a partire dal 12 Novembre 2010 sono stati considerati potenzialmente contaminati
- Le 2256 tons di grasso potenzialmente contaminato sono state consegnate da Harles & Jentzsch a 25 fabbriche di mangime in Germania. Nessuna consegna è stata fatta a imprese non tedesche.
- I mangimi prodotti con i grassi sotto inchiesta erano destinati a galline ovaiole, polli, tacchini, suini, vacche da latte, conigli ed oche, quasi esclusivamente allevati in Germania. Sulla base delle informazioni disponibili, sono stati consegnati fuori dalla Germania alcuni lotti di mangime per galline riproduttrici, in Danimarca ed in Francia. Di quelli consegnati in Danimarca, due sono risultati contaminati al di sopra delle soglie UE (e le galline implicate sono state escluse dalla catena alimentare), mentre i due lotti spediti in Francia sono risultati non contaminati.
- Tutto il grasso, il mangime con esso prodotto e le aziende agricole che lo avevano ricevuto sono stati bloccati in via precauzionale, in attesa delle analisi. Inizialmente erano implicate 4760 aziende agricole in Germania, mentre questo numero è stato ridotto a 316 il 14 Gennaio 2011 in seguito ai risultati delle analisi eseguite.
- Uno dei mangimisti aveva fornito informazioni incomplete sulle aziende che avevano ricevuto i mangimi potenzialmente contaminati e aveva dato false informazioni sull'uso dei grassi nelle proprie produzioni: in seguito a ciò le Autorità

tedesche hanno nuovamente ri-sequestrato tutte le aziende agricole clienti di quel mangimificio (in attesa delle analisi), ed hanno avviato una denuncia legale contro il fabbricante di mangime: pertanto ad oggi 24 Gennaio 2011 le aziende bloccate sono 589 in tutto.

- Le aziende bloccate sono principalmente aziende suinicole ed avicole, e qualche azienda da latte.
- *La società produttrice dei grassi Harles & Jentzsch, ammettendo le proprie responsabilità, ha chiesto il fallimento il giorno 12 .01.2011 (<http://www.allaboutfeed.net/news/dioxin-scandal-fat-supplier-files-for-bankruptcy-id5162.html>)*
- Dei 174 campioni di uova e carni prelevati nelle aziende da uova bloccate, 143 erano in regola con la legislazione UE (massimo 3 pg./g. di grasso per le uova, 2 pg./g. di grasso nel muscolo). Il livello massimo rilevato è stato di 12 pg./g. nelle uova, mentre nelle carni (tessuto muscolare di galline ovaiole) il livello massimo rilevato è stato di 4,99 pg.
- I risultati delle analisi su 102 campioni di carne suina prelevati nelle aziende potenzialmente contaminati si sono altresì resi disponibili. 101 campioni su 102 sono risultati in regola con la normativa UE (max 1 pg./g. di grasso). Su un campione il risultato è stato leggermente eccedente i valori soglia, considerando l'incertezza della misura (livello riscontrato 1,51 pg./g.): si tratta di suini che avevano consumato un mangime con alte percentuali di grasso contaminato. Questi animali non entreranno nella catena alimentare.
- I risultati analitici ottenuti dalle carni di pollo, tacchino e bovino, così come dai campioni di latte, sono risultati tutti in regola rispetto ai massimi stabiliti dalla UE.
- I prodotti alimentari derivati dagli animali allevati nelle aziende risultate positive sono stati rintracciati ed eliminati dal mercato.
- Sulla base delle informazioni disponibili al 24 01 2011, nessun prodotto di origine animale contaminato è stato venduto in altri Stati Membri o Paesi Terzi, con l'eccezione di due lotti di uova potenzialmente inquinati venduti in Olanda. Dopo trasformazione, uno di questi lotti è poi stato ceduto un UK. Il 10 Gennaio il risultato delle analisi sui lotti di uova inviati in Olanda ha mostrato un livello ampiamente al di sotto della soglia ammissibile (0,23 pg./g. rispetto ad un massimo di 3 pg./g.). Anche le carni provenienti da un lotto di 35 suini venduti in Polonia e Repubblica Ceca soddisfacevano i parametri UE.
- Qualora emergessero ulteriori esportazioni verso Stati Terzi, le competenti autorità saranno immediatamente informate del fatto tramite il RASFF.

## **RISULTATI**

La vicenda, focalizzata esclusivamente sulle uova “alla diossina” ha occupato zone marginali dei giornali italiani nei giorni dal 3-4 fino all'11 Gennaio 2011. In quella data si diffonde l'informazione che anche allevamenti di suini sono implicati.

Di conseguenza compaiono pagine di giornale con le ben note immagini di suini ed accompagnamento di notizie varie sugli allevamenti ed i fabbricanti di mangime.

Maliziosamente alcuni giornali (ad esempio La Stampa del 12.01.2011) dedicando un intero paginone al tema affiancano alle notizie sulla diossina nella carne di suino articoli sulla recrudescenza (tutta di ambito umano) di casi di mortalità da virus influenzale H1N1 (già definita influenza “suina”), componendo un quadretto generale che lascia quantomeno agitati e non ben disposti verso salsicce e mortadelle i disciplinati lettori.

Tutto era dunque pronto per seguire passo passo una vicenda che, partendo da notizie

chiaramente allarmistiche, ha impiegato comunque altri 15 giorni per giungere con documenti ufficiali ad una chiara conclusione.

Il 14 gennaio scoppia sui giornali il caso “bunga bunga”. La Procura di Milano ordina perquisizioni in alcune abitazioni private di giovani e avvenenti ragazze, ipotizzandone un rapporto non esattamente filiale con un anziano e molto conosciuto uomo politico, che occupa la carica di Presidente del Consiglio. Sono coinvolti anche vecchi giornalisti, noti omosessuali e prostitute dichiarate. In questa situazione non si capisce bene cosa sia il “bunga bunga”: potrebbe essere una danza a sfondo sessuale, il soprannome di una delle ragazze, o meno probabilmente il lecca-lecca preferito di una delle anziane persone coinvolte. Resta il fatto che la voracità informativa di tutti i mezzi di stampa e televisione si concentra da quel momento sul caso “bunga bunga”, e come per miracolo ci si dimentica dei maiali (quelli allevati), della diossina, e di tutto il resto.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONE**

Se non fosse sopravvenuto il caso “bunga bunga” il consumo di prodotti di origine suina in Italia sarebbe probabilmente calato, sulla scorta emotiva di martellanti informazioni da parte degli organi di stampa, come già avvenuto in altre circostanze.

Conseguenza del calo dei consumi sarebbe stata anche una riflessione sul piano delle quotazioni, per quanto fossero già ai limiti della sopportabilità ( in Germania negli stessi giorni il prezzo dei suini è calato fino a 1,12 €/kg, <http://www.pigprogress.net/news/eu-to-assist-pork-farmers-in-the-midst-of-falling-prices-6932.html>) stimolando anche un intervento diretto da parte della Comunità nella gestione economica della crisi.

Dunque sulla scorta di quanto osservato si può concludere:

1. Anche questa volta un caso ritenuto meritevole di occupare pagine intere di giornali si è rivelato privo di rilevanza nella gestione della salute pubblica (nota informativa UE del 24 Gennaio 2011)
2. Il sistema rapido di allerta europeo (RASFF) si è dimostrato efficace e puntuale, punendo in maniera selettiva quegli operatori della filiera che si sono comportati in modo non trasparente o che non disponevano di un adeguato e funzionante sistema di rintracciabilità (nota informativa UE del 24 Gennaio 2011)
3. Il caso “bunga bunga” ha distratto i giornali e le TV dal tema della diossina, dando un po’ di respiro ad un settore già di suo in gravissima crisi
4. Alcuni allevatori tedeschi, visto quel che succedeva in Italia, hanno inutilmente chiesto al Cancelliere in carica di sacrificarsi per loro, in una sorta di “bunga bunga” in salsa teutonica. Non hanno avuto risposta.
5. Gli allevatori italiani, quale che sia la loro opinione sul caso “bunga bunga”, ne hanno certamente beneficiato indirettamente, e possono scegliere liberamente a chi, tra i vari personaggi implicati, è più conveniente indirizzare la loro riconoscenza.
6. Si conferma la veridicità del mottetto popolare secondo il quale è più facile che un vecchio diventi porco piuttosto che un porco diventi vecchio.

# CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DEGLI ISOLAMENTI DI *ESCHERICHIA COLI* DA INFEZIONI URINARIE (UTI) DELLE SCROFE

## GENOTYPING AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM URINARY TRACT INFECTIONS (UTI) IN SOWS

GUSMARA C.<sup>1</sup>, LAUZI S.<sup>1</sup>, ANDREONI S.<sup>2</sup>, LORENZI V.<sup>1</sup>, BARZETTI C.<sup>1</sup>, SALA V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria

<sup>2</sup> - Università degli Studi di Milano - Scuola di Specializzazione in Patologia Suina

**Parole chiave:** scrofa, infezioni urinarie, *E. coli*, genotipizzazione.

**Key words:** sow, urinary tract infections, *E. coli*, genotyping.

**Riassunto.** I ceppi di *E. coli* isolati da UTI delle scrofe sono stati analizzati in PCR per l'identificazione di diversi fattori di virulenza e del gruppo filogenetico di appartenenza. La maggior parte dei ceppi è stata positiva per le fimbrie tipo 1 e per l'aerobactina. Gli isolamenti differiscono da quelli dell'uomo per il profilo di adesione e per l'emolisina: le fimbrie tipo P e tipo S, così come l'emolisina, sono meno frequenti nei ceppi suini che, a differenza di quelli umani sono, per lo più, classificati nei gruppi filogenetici A e B1. Di tutti gli isolamenti è stata verificata l'antibiotico-sensibilità nei confronti dei principi attivi più frequentemente utilizzati per la terapia delle UTI nelle scrofe.

**Summary.** Porcine *E. coli* strains have been analyzed by PCR for the presence of several virulence factors and identified with regard to placement in the phylogenetic groups. The majority of the tested strains harboured type 1 fimbriae and aerobactin. The strains were quite different from human uropathogenic ones about the adhesion profile and haemolysin, since P and S fimbriae were significantly lower in porcine strains as was haemolysin. Differences with human strains were also observed related to phylogenetic groups, since our strains belonged to *E. coli* clonal groups A and B1. All isolates were tested for sensitivity to antibiotics most frequently used in the treatment of UTI in sows.

### INTRODUZIONE

Infezioni a origine ed eziologia variabile possono interessare le diverse parti dell'apparato urinario della scrofa; tutti i microrganismi coinvolti sono in grado di moltiplicare nell'escreto e alcuni anche di aderire all'epitelio di transizione delle vie urinarie. La loro origine può essere, di volta in volta, enterica, cutanea o ambientale.

Se per un'esposizione ambientale condizionata o in conseguenza di endometriti subacute o croniche, i batteri fecali colonizzano la vagina e l'immunità locale non è in grado di delimitarne la moltiplicazione, l'infezione risale lungo l'uretra, relativamente corta nella scrofa, e raggiunge la vescica; in questa sede, se le condizioni sono idonee, i batteri danno inizio a un processo acuto che può facilmente cronicizzare e, nei casi più gravi, anche estendersi alle vie urinarie e ai reni, sotto forma di pielonefriti e nefriti interstiziali (Martineau & Almond, 2008).

In patologia suina, l'interesse per questi processi è cresciuto solo in anni recenti, in concomitanza con l'evoluzione delle conoscenze sulle batteriosi opportunistiche; le interferenze sull'efficienza riproduttiva (bassa prolificità, ritorni in calore, parti languidi e

natimortalità eccessiva) e l'importanza del problema tra le cause di mortalità e riforma delle scrofe hanno motivato l'interesse di alcuni gruppi di ricerca in Europa.

In un precedente lavoro (Gusmara & coll., 2010) condotto su 690 scrofe di 16 allevamenti, avevamo segnalato come le infezioni urinarie fossero presenti nel 15,2% dei casi (105 scrofe) e come tutti gli allevamenti fossero interessati dal problema, seppur con un'incidenza variabile (dal 2,5 al 32,1%); le specie batteriche evidenziate a una concentrazione almeno pari a 100.000 UFC/ml di urina, indicativa di un processo patologico in corso, sono riportate nella successiva tabella 1, dove appare evidente la prevalenza dei batteri di origine fecale, con una netta predominanza colibacillare.

Batteri isolati	N. isolamenti	% sugli isolamenti
<i>Escherichia coli</i>	94	89,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,9
<i>Proteus spp.</i>	1	0,9
<i>E. coli</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>E. faecalis</i>	1	0,9
<i>E. coli</i> + <i>E. faecalis</i>	2	1,9
<i>Staphylococcus spp.</i>	2	1,9

**Tabella 1.** Batteri isolati in casi di UTI (Gusmara & coll., 2010).

**Table 1.** Bacterial isolates in UTI cases.

Accertata dunque una prevalenza, del resto ipotizzabile, di *E. coli* tra i batteri responsabili di UTI nella scrofa, restano aperti gli interrogativi sulla provenienza dei ceppi coinvolti e, di conseguenza, sulle effettive possibilità di prevenzione e controllo del problema; gli obiettivi di questo lavoro sono perciò in primo luogo la mappatura genomica degli isolamenti da UTI acute subacute per stabilirne provenienza ed effettiva virulenza, e secondariamente la verifica dei livelli di antibiotico-resistenza nella prospettiva degli interventi di controllo e prevenzione.

Nella specie *Escherichia coli* sono classificati quattro gruppi filogenetici denominati A, B1, B2 e D; gran parte degli isolamenti responsabili d'infezioni e patologie extra-intestinali è catalogata nel gruppo B2 mentre solo una minoranza rientra nel gruppo D. I ceppi commensali sono invece inquadrati nel gruppo A (Picard & coll., 1999).

Gli *E. coli* appartenenti al patotipo UPEC (uropatogeni) costituiscono un gruppo geneticamente eterogeneo, caratterizzato da diversi fattori di virulenza associati alla colonizzazione e alla persistenza nell'apparato urinario (Marrs & coll., 2005); i fattori di virulenza principali sono le adesine (fimbrie tipo 1, P e S), le tossine (emolisina, fattori necrotizzanti citotossici), l'aerobactina e la capsula del tipo II.

La patogenicità per l'epitelio urinario è mediata dalle adesine, grazie alle quali gli UPEC resistono all'azione idromeccanica del flusso urinario, stabilendo anzi in questa sede una nicchia di moltiplicazione; le fimbrie del tipo 1, codificate dai geni *fim* sono responsabili dell'adesione alle cellule epiteliali della vescica.

Altre adesine sono le fimbrie del tipo P, codificate dai geni *papG*, che mediano l'attacco ai recettori presenti sulle cellule uroteliali e dei quali sono state identificate diverse classi: quelli della classe II sono più presenti negli isolamenti che causano pielonefrite, mentre quelli della classe III sono prevalenti nei ceppi responsabili di cistite (Marrs & coll., 2002). Le fimbrie

del tipo S riconoscono infine i recettori dell'ambito renale, vescicale e ureterale (Marre & coll., 1986).

Per altri *E. coli*, il meccanismo di permanenza nel tratto urinario è la elevata velocità di replicazione (Roos & coll., 2006).

Le tossine sono fattori di virulenza importanti in molte patologie coli bacillari: quelle più frequentemente associate agli UPEC sono l' $\alpha$ -emolisina e il fattore necrotizzante citotossico 1 (CNF1); quest'ultimo è stato identificato anche nei ceppi necrotossigeni (NTEC) responsabili di gravi infezioni extraintestinali nell'uomo. Gli stessi producono anche CNF2, di solito associato a ceppi provenienti da animali sani o isolati in corso di diarrea nei ruminanti; recentemente è stato identificato negli isolamenti dai piccoli ruminanti un terzo fattore necrotizzante citotossico (CNF3) (Orden & coll., 2007).

Un altro importante meccanismo patogenetico è la capacità di *E. coli* di acquisire il ferro dai fluidi organici; il fattore di virulenza preposto è l'aerobactina, un sideroforo prodotto ed escreto in carenza di ferro, sintetizzato dai geni *iuc*, mentre le proteine codificate dai geni *iut* ne mediano il trasporto. È stata dimostrata una correlazione diretta tra la produzione di aerobactina e la patogenicità: infatti, la si ritrova nel 6% dei ceppi di derivazione ambientale e nel 38% di quelli isolati da batteriurie asintomatiche e da feci, mentre la prevalenza sale al 73% negli isolamenti da cistiti, batteriemie e pielonefriti. L'aerobactina è frequentemente associata alle fimbrie P e all'emolisina nei ceppi isolati da pielonefriti e sepsi di origine urinaria (Katouli et al., 2005).

Infine, sembrano più associati agli UPEC che ai ceppi di provenienza fecale i geni *kptMS*, che codificano per la capsula di tipo II (Kanamaru & coll., 2003).

## Materiali e metodi

### *Ceppi batterici*

Sono stati considerati 77 isolamenti di *Escherichia coli* provenienti da 12 allevamenti in cui è stata accertata la presenza di infezioni urinarie nelle scrofe; tutti i ceppi provengono da prelievi di urine con una carica batterica  $>10^5$  UFC/ml e sono stati successivamente isolati in colonia singola utilizzando le tecniche batteriologiche classiche.

Dopo la tipizzazione su base biochimica, gli stipti batterici sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  in Nutrient Broth (Oxoid) addizionato con glicerolo (15% v/v) fino al passaggio di rivitalizzazione su agar sangue di montone al 5%; le subcolture di questo passaggio sono state utilizzate per la verifica dell'antibiotico-sensibilità e per la genotipizzazione (eseguita su singola colonia).

### *Caratterizzazione genotipica*

Il DNA genomico di tutti i ceppi di *E. coli* è stato estratto mediante bollitura e poi analizzato mediante diverse PCR, utilizzando le indicazioni presenti in letteratura e schematizzate in Tabella 2; ogni isolamento è stato quindi sottoposto ad analisi dei gruppi filogenetici, applicando la multiplex PCR descritta da Clermont e collaboratori (Clermont & coll., 2000).

Sempre mediante PCR, ogni ceppo è stato esaminato per la presenza dei diversi geni associati ai fattori di virulenza: il *panel* utilizzato comprende i geni che codificano per le fimbrie tipo I (gene *fimH*), fimbrie tipo P (geni *papC*, *papE/F*, *papG classe I*, *papG classe II*, *papG classe III*), fimbrie tipo S (gene *sfaD/E*), emolisina (gene *hlyA*), fattori necrotizzanti citotossici (geni *cnf1*, *cnf2*, *cnf3*), aerobactina (geni *iucD* e *iutA*) e per la capsula tipo II (gene *kpsMTII*) (Johnson & Stell, 2000; Toth & coll., 2003; Orden & coll., 2007; Tiba & coll., 2008).

I ceppi positivi per la ricerca dei geni *cnf1* e *cnf2* sono stati sottoposti a sequenziamento per identificarne il tipo; le reazioni di sequenza sono state allestite direttamente dai prodotti di PCR. I prodotti di PCR sono stati purificati, e successivamente sequenziati (chimica del Big Dye terminator v3.1) in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi primer di PCR, secondo le

istruzioni della ditta produttrice (Applied Biosystems, Italia). I prodotti del *cycle sequencing* sono stati analizzati mediante il sequenziatore AB 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Italia). Le sequenze dei campioni sono state analizzate confrontandole con le sequenze di *cnf1* e *cnf2* depositate in banca dati. L'analisi dell'omologia di sequenza nucleotidica (BLAST), l'assemblaggio e l'allineamento delle sequenze dei campioni e di quelle presenti in banca dati sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html>) e i sistemi di analisi NCBI's (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tabella 2.** *Geni target e primer utilizzati per la caratterizzazione dei fattori di virulenza e per la tipizzazione dei gruppi filogenetici.*

**Table 2.** *Target genes and primers used for the characterization of the virulence factors and for the typing of phylogenetic groups.*

Gene target	Primer	Prodotto atteso	Bibliografia
<i>fimH</i>	fimH F e fimH R	508	Tiba & coll., 2008
<i>papC</i>	papC F e papC R	328	Tiba & coll., 2008
<i>papE/F</i>	papE/F F e papaE/F R	336	Tiba & coll., 2008
<i>papG classI</i>	papGI F e papGI R	692	Tiba & coll., 2008
<i>papG classII</i>	papGII F e papGII R	562	Tiba & coll., 2008
<i>papG classIII</i>	papGIII F e papGIII R	421	Tiba & coll., 2008
<i>sfaD/E</i>	sfaD/E F e sfaD/E R	410	Tiba & coll., 2008
<i>hlyA</i>	hlyA F e hlyA R	1177	Tiba & coll., 2008
<i>cnf1-cn2</i>	CNFs F e CNFs R	633	Toth & coll., 2003
<i>cnf3</i>	CNF3 F e CNF3 R	1246	Orden & coll., 2007
<i>iucD</i>	iucD F e iucD R	602	Tiba & coll., 2008
<i>iutA</i>	AerJ F e AerJ R	302	Johnson & Stell, 2000
<i>kpsMTII</i>	kpsMTII F e kpsMTII R	272	Tiba & coll., 2008
<i>chuA</i>	chuA F e chuA R	279	Clermont & coll., 2000
<i>yjaA</i>	yjaA F e yjaA R	211	Clermont & coll., 2000
TspE4.C2	TspE4.C2 F e TspE4.C2 R	152	Clermont & coll., 2000

### *Antibiogramma*

Gli antibiogrammi sono stati eseguiti su Mueller-Hinton Agar (Difco-DID), applicando la tecnica degli aloni d'inibizione secondo Kirby & Bauer (Bauer, 1959); aggiustando le sospensioni batteriche per l'inoculo al livello 0,5 della scala di McFarland.

Tra i diversi principi attivi solitamente utilizzati in suinocultura sono stati selezionati sei antibatterici, potenzialmente efficaci per meccanismo d'azione ed escreti per via renale: tre fluorochinoloni (Enrofloxacin, Marbofloxacin e Danofloxacin) due aminoglicosidi (Aminosidina e Gentamicina) e l'associazione Trimethoprim-Sulfadimetossina.

### **Risultati**

L'utilizzo della metodica di PCR di Clermont e collaboratori (Clermont & coll., 2000), ha permesso di classificare tutti i 77 ceppi di *E. coli* nei gruppi filogenetici; in particolare, 42 ceppi (54,5%) sono risultati appartenenti al gruppo A, 32 (41,6%) al gruppo B1 e 3 (3,9%) al gruppo D. Non sono stati identificati ceppi di *E. coli* appartenenti al gruppo B2. I risultati delle analisi di PCR per l'identificazione dei fattori di virulenza sono riportati in Tabella 3.

**Tabella 3.** Positività per i geni di virulenza e il gruppo filogenetico nei ceppi di *E. coli* analizzati.  
**Table 3.** Positivity for virulence genes and phylogenetic group of analyzed *E. coli* strains

Gene	Gruppo A (%)	Gruppo B1 (%)	Gruppo B2 (%)	Gruppo D (%)	Totale (%)
<i>fimH</i>	31 (73,8)	25 (78,1)	0 (0)	2 (66,7)	58 (75,3)
<i>papC</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>papE/F</i>	0 (0)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)
<i>papG I</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>papG II</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>papG III</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>sfaD/E</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>hlyA</i>	0 (0)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)
<i>cnf1-2</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>cnf3</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>iucD</i>	16 (38,1)	19 (59,4)	0 (0)	1 (33,3)	36 (46,8)
<i>iutA</i>	13 (31,0)	20 (62,5)	0 (0)	0 (0)	33 (42,9)
<i>kpsMTII</i>	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)

Per quanto riguarda le adesine, il gene *fimH* è quello più presente: infatti, le fimbrie tipo 1 si ritrovano in 58 ceppi (75,3%), con una percentuale sovrapponibile tra i filogruppi; i 19 isolamenti in cui non è stato identificato il gene *fimH* non appartengono a un unico gruppo filogenetico.

La positività per le fimbrie tipo P è stata osservata in due (2,6%) ceppi del gruppo B1 e si caratterizza per la presenza del gene *papG* di classe III; entrambi i ceppi mostrano un profilo compatibile con fimbrie tipo P funzionali, perché sono positivi anche per gli altri geni del cluster *pap* (geni *papC* e in un ceppo solamente i geni *papE/F*).

Due ceppi (2,6%) sono positivi per il gene *sfaD/E*, che codifica per le fimbrie tipo S e sono classificabili nel gruppo B1; in uno di questi (3,1%), è stata dimostrato il gene che codifica per l'emolisina (*hlyA*).

La positività per i geni *cnf1* e *cnf2*, che codificano per i fattori necrotizzanti citotossici, è stata rilevata in due ceppi (2,6%) del gruppo B1; il sequenziamento ha permesso l'identificazione del fattore citotossico necrotizzante di tipo 1 (CNF-1). Non è stata dimostrata positività per il gene che codifica per CNF3.

Il sistema dell'aerobactina si trova in molti degli isolamenti: il gene *iucD* è stato identificato in 36 ceppi (46,8%) e il gene *iutA* in 33 (42,9%); nel gruppo B1, entrambi i geni sono presenti in 28 ceppi (36,4%), mentre in 8 (10,4%) è presente solo il gene *iucD* e in 5 (6,5%) soltanto *iutA*.

Infine, per quanto riguarda la capsula tipo II, un solo ceppo (1,3%) del gruppo A è stato positivo al gene *kpsMTII*.

Nell'analisi combinata dei geni di virulenza, 8 ceppi (10,4%) ceppi non ne presentano, 25 (32,5%) ne presentano uno solo e in 44 (57,1%) se ne trovano due o più (Tabella 4). Dei ceppi che non presentano geni di virulenza, 6 sono del gruppo A e uno ciascuno dei gruppi B1 e D.

**Tabella 4.** Associazione tra fattori di virulenza in ceppi di *E. coli* isolati.  
**Table 4.** Association among virulence factors in *E. coli* isolates.

Profilo dei geni di virulenza	Numero dei ceppi (%)
<i>fimH</i>	25 (32,5)
<i>iucD-iutA</i>	9 (11,7)
<i>fimH-iucD</i>	8 (10,4)
<i>fimH-iutA</i>	5 (6,5)
<i>fimH-sfaD/E</i>	1 (1,3)
<i>fimH-hlyA</i>	1 (1,3)
<i>fimH-kpsMTII</i>	1 (1,3)
<i>fimH-iucD-iutA</i>	16 (20,8)
<i>iucD-iutA-cnfl</i>	1 (1,3)
<i>papC-papG-cnfl-iucD-iutA</i>	1 (1,3)
<i>fimH-papC-papE/F-papG-sfaD/E-iucD-iutA</i>	1 (1,3)
Nessun gene	8 (10,4)
<b>Totale</b>	<b>77 (100)</b>

Tra i ceppi considerati, sono stati identificati undici possibili profili di virulenza: 41 isolamenti (53,2%) hanno presentato i profili *fimH* (25 ceppi, 32,5%) o *fimH-iucD-iutA* (16 ceppi, 20,8%); analizzando il background filogenetico del profilo *fimH*, la distribuzione è maggiore nei ceppi del gruppo A (17) rispetto a quelli del gruppo B1 (7) e il profilo si osserva anche in un *E. coli* del gruppo D.

Per il profilo *fimH-iucD-iutA* la positività è maggiore nei ceppi del gruppo B1 (10) rispetto a quelli del gruppo A (6);

per gli altri profili di virulenza, i ceppi che presentano il profilo *iucD-iutA* appartengono in modo simile al gruppo A (5 ceppi) o al gruppo B1 (4 ceppi).

Il profilo *fimH-iucD* è prevalente nei ceppi del gruppo A (5 casi), mentre sono positivi 2 del gruppo B1 e uno del D; il profilo *fimH-iutA* si osserva in modo uniforme tra i ceppi del gruppo B1 (3 ceppi) e A (2 ceppi).

I geni *papG* si trovano nei profili con quattro o più geni di virulenza, tra cui *iucD* e *iutA*; profili simili, con la presenza di *papG* e/o *cnfl* sono stati riscontrati negli isolamenti del gruppo B1. Questi ultimi risultano inoltre positivi per i profili *fimH-sfaD/E* e *fimH-hlyA* mentre il profilo *fimH-kpsMTII* si osserva in un ceppo del gruppo A.

#### Sensibilità agli antibiotici

I risultati delle prove di sensibilità agli antibiotici, eseguiti con la tecnica degli aloni d'inibizione, sono qui di seguito riportati nella Tabella 5.

**Tabella 5.** Risultati degli antibiogrammi (metodo degli aloni d'inibizione).  
**Table 5.** Results of the antibiotic-sensitivity test (Kirby-Bauer technique).

	Isolamenti		
	Sensibili (%)	Intermedi (%)	Resistenti (%)
<b>Aminosidina</b>	52 (67,5)	7 (9,1)	18 (23,4)
<b>Gentamicina</b>	47 (61)	19 (24,7)	11 (14,3)
<b>Danofloxacine</b>	44 (57,1)	13 (16,9)	20 (26)
<b>Enrofloxacin</b>	40 (51,9)	12 (15,6)	25 (32,5)
<b>Marbofloxacine</b>	59 (76,6)	4 (5,2)	14 (18,2)
<b>Trimethoprim + Sulfadimetossina</b>	13 (16,9)	0 (0)	64 (83,1)

## DISCUSSIONE

*Escherichia coli* è il principale agente eziologico delle infezioni urinarie (UTI) in molte specie animali e nell'uomo; e nella maggior parte dei casi, e così avviene anche nelle scrofe, i ceppi in grado di determinare le forme cliniche si selezionano dalla flora fecale e le loro capacità patogeniche dipendono dal loro corredo di fattori di virulenza.

Questi ultimi, codificati dai rispettivi geni, consentono ai batteri di aderire all'urotelio della mucosa, favoriscono la colonizzazione e la persistenza nel tratto urinario, causando una risposta infiammatoria locale e, in qualche caso, anche lesioni tissutali (Mulvey, 2002).

Obiettivo principale del nostro lavoro è stato dunque l'individuazione dei fattori di virulenza degli isolamenti di *E. coli*, provenienti da UTI acute o subacute di scrofe a diversi livelli di carriera; allo scopo, è stato impiegato un sistema genotipico basato sulla metodica di PCR. Considerando le similitudini anatomiche e fisiologiche, era attesa una certa similitudine tra i fattori di virulenza dei ceppi UPEC dell'uomo e del suino.

È stata confermata la prevalenza elevata del gene *fimH*, identificato in 58 ceppi, in 25 dei quali non sono stati dimostrati altri geni di virulenza; ciò conferma che le fimbrie tipo 1 sono fattori importanti, che possono contribuire alla patogenicità dei ceppi di *E. coli*. A questo proposito, è stata avanzata l'ipotesi che l'adesione mediata da tali fimbrie possa avere un ruolo importante nell'induzione di processi infiammatori, aumentando la patogenicità dei ceppi che le possiedono (Tiba & coll., 2008).

Trentatré isolamenti positivi per *fimH* presentano anche altri geni di virulenza. La presenza di altre adesine, codificate dai geni *pap* o *sfa*, è presente, seppur in un numero ridotto di casi; questo dato conferma l'associazione, già segnalata negli UPEC (Johnson & coll., 2005) del gene *fimH* con le fimbrie tipo P e S.

Le fimbrie del tipo P contribuiscono alla patogenesi delle infezioni, promuovendo la colonizzazione di *E. coli* e stimolando una risposta infiammatoria spesso imponente (Wullt & coll., 2000).

Le analisi in PCR sono state eseguite anche per il rilievo dei geni associati alla *outer membrane usher* (*papC*), alla sub-unità strutturale minore (*papE/F*) e all'allele per le adesine *papG* (*papGI*, *papGII*, *papGIII*); le classi di quest'ultimo genotipo si differenziano sulla base della specificità recettoriale e del tipo di infezione (Mulvey, 2002): quelle di classe II sono frequenti nei casi di pielonefrite e batteriemia, mentre quelle di classe III si trovano prevalentemente in caso di cistite, e più raramente nella pielonefrite e nella batteriemia (Féria & coll., 2001).

I ceppi *papGI* dovrebbero essere più diffusi tra quelli di derivazione fecale. Diversamente da quanto riportato in letteratura, solo due ceppi tra quelli considerati sono positivi per i geni *papG* e in particolare per quello di classe III; una positività così bassa non era nelle attese e potrebbe

indicare un minor livello di patogenicità degli isolamenti, validando di fatto la connotazione delle UTI della scrofa come sindrome condizionata da fattori che aumentano la recettività individuale, anche nei confronti di batteri relativamente patogeni.

L'associazione delle fimbrie tipo P con l'aerobactina, evidenziata in entrambi i ceppi positivi per i geni *papG*, è supportata dai dati di letteratura, che indicano la presenza contemporanea di questi due fattori nei ceppi che causano cistite (Katouli & coll., 2005); le fimbrie tipo S sono associate a *E. coli* che provocano pielonefrite, meningite e sepsi, anche se recentemente è stato ipotizzato un loro ruolo nelle cistiti (Tiba & coll., 2008); tra quelli analizzati e come riportato in letteratura (Tiba & coll., 2008) solo due presentano contemporaneamente il gene *sfaD/E* e altri tipi di adesine (*fimH* e/o geni *pap*).

Negli UPEC dell'uomo, l'emolisina è un fattore di virulenza molto importante (Raksha & coll., 2003) mentre per quanto riguarda il suino, le indicazioni della letteratura riportano una positività variabile tra 0% e 25,8%; più recentemente, Krag e collaboratori hanno dimostrato l'emolisina nel 5% dei ceppi analizzati (Krag & coll., 2009). Pertanto, la verifica della sua presenza nei ceppi di derivazione suina era uno degli obiettivi del lavoro; invece, il gene *hlyA* che codifica per questo fattore, è stato dimostrato in un solo isolamento (1,3% sul totale).

Il gene *cnf1*, identificato in due ceppi, è presente in associazione con altri fattori di virulenza, in particolare *iucD* e *iutA* e in un ceppo anche con le fimbrie del tipo P; la presenza simultanea di CNF1, fimbrie di tipo P e emolisina, codificati da geni presenti nella stessa isola di patogenicità e segnalata negli isolamenti dall'uomo (Johnson & Stell, 2000) non è invece stata evidenziata nei ceppi da noi considerati.

L'acquisizione del ferro è indispensabile e quindi critica per i patogeni che moltiplicano nei siti di infezione extra-intestinali, dove la concentrazione di questo ione è normalmente scarsa; uno dei sistemi di acquisizione del ferro è la produzione di siderofori, codificata dai geni *iucD* e *iutA* e presente in molti dei ceppi analizzati (*iucD* 46,8% e *iutA* 42,9%).

Gran parte dei ceppi UPEC responsabili di pielonefrite nell'uomo presenta una capsula di tipo II (Tiba & coll., 2008) mentre negli isolamenti dalla scrofa è presente in un solo caso.

Le combinazioni dei fattori di virulenza nei ceppi di *E. coli* individuano diversi profili e gruppi filogenetici diversi; profili di virulenza simili in ceppi appartenenti a gruppi filogenetici diversi può essere indicativa della trasmissibilità dei geni correlati alla virulenza (Graziani & coll., 2009).

Per concludere, i profili di virulenza dei ceppi analizzati non sono sempre sovrapponibili a quelli degli UPEC dell'uomo; in particolare, nei ceppi suini la presenza delle fimbrie (P e S) e dell'emolisina è inferiore rispetto a quelli umani. L'analisi dei gruppi filogenetici ha rilevato nelle scrofe una presenza preponderante del gruppo A e del gruppo B1, confermando quanto riportato in letteratura riguardo ai suini (Krag & coll., 2009), mentre nell'uomo i ceppi uropatogeni appartengono ai gruppi B2 e D. I nostri dati indicano che i ceppi con più di un fattore di virulenza prevalgono nel gruppo B1 rispetto al gruppo A; è anche da rimarcare la presenza di tre ceppi del gruppo D, normalmente associato alle patologie nell'uomo e così poco diffuso nel suino da non consentire conclusioni specifiche sull'effettivo ruolo patogeno.

Le fimbrie del tipo 1 e il sistema aerobactina sono i fattori di virulenza più diffusi negli isolamenti esaminati e ciò rende legittima l'ipotesi che da soli abbiano un ruolo importante nella colonizzazione delle vie urinarie delle scrofe; ciò non si verifica nell'uomo, dove sembrano essere necessari altri fattori di virulenza, ed è quindi probabile che le condizioni degli animali o l'ambiente favoriscano l'infezione.

Riguardo all'antibiotico-sensibilità, è evidente che la maggior parte degli isolamenti è sensibile ai principi attivi esaminati (eccezion fatta per l'associazione trimethoprim-sulfadimetossina); considerando la poli-antibiotico-resistenza spesso associata alle forme enteriche giovanili del suino, questa indicazione va interpretata riguardo alla provenienza delle infezioni.

Marbofloxacin è il principio attivo più efficace tra i fluorochinoloni, mentre tra gli aminoglicosidi, amikacin ha dato risultati migliori rispetto a gentamicina; sono invece piuttosto sconcertanti, e confermano le oggettive difficoltà d'impiego terapeutico, i risultati ottenuti con l'associazione sulfamidico-trimethoprim.

Infine, è opportuno non dimenticare che gli isolamenti provengono da casi conclamati di UTI e che quindi il mantenimento dell'antibiotico-sensibilità potrebbe rappresentare un indicatore di "mancato trattamento", vale a dire dell'ancora scarsa sensibilità degli allevatori a un problema che in altre realtà suinicole (soprattutto nord-Europee) è stato già da tempo affrontato e in buona misura risolto.

Questo lavoro costituisce la logica prosecuzione di un percorso di ricerca sulle UTI, iniziato con la verifica dell'effettiva presenza del problema nelle scrofaie italiane; in quella sede era stata dimostrata l'importanza eziologica di *Escherichia coli*, mentre in questo studio abbiamo considerato la connotazione genomica degli isolamenti dalle scrofe, per verificarne l'espressione patogena e l'eventuale similitudine con gli analoghi uropatogeni dell'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

- Clermont O., Bonacorsi S. & Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.*; 66(10): 4555-8.
- Féria C., Machado J., Duarte Correia J., Gonçalves J. & Gaastra W. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol Lett.*; 202(2): 205-8.
- Graziani C., Luzzi I., Corro M., Tomei F., Parisi G., Giuffrè M., Morabito S., Caprioli A. & Cerquetti M. (2009). Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. *J Infect Dis.*; 199(8): 1209-17.
- Gusmara C., Invernizzi F., Andreoni S., Teli L., Mazzotti A. & Sala V. (2010). Osservazioni diagnostiche sulle infezioni urinarie (uti) della scrofa". *Atti del XXXVI Meeting della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, pag. 198-204.
- Johnson J.R., Kuskowski M.A., O'Bryan T.T., Colodner R. & Raz R. (2005). Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 49(1): 26-31.
- Johnson J.R. & Stell A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.*; 181(1): 261-72.
- Kanamaru S., Kurazono H., Ishitoya S., Terai A., Habuchi T., Nakano M., Ogawa O. & Yamamoto S. (2003). Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors iroN, iha, kpsMT, ompT and usp in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol.*; 170(6 Pt 1): 2490-3.
- Katouli M., Brauner A., Haghghi L.K., Kaijser B., Muratov V. & Möllby R. (2005). Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in young adults in Iran. *J Infect.*; 50(4): 312-21.
- Krag L., Hancock V., Aalbaek B. & Klemm P. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. *Vet Microbiol.*; 134(3-4): 318-26.
- Marre R., Hacker J., Henkel W. & Goebel W. (1986). Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect. Immun.* 54: 761-67.
- Marrs C.F., Zhang L., Tallman P., Manning S.D., Somsel P., Raz. P, Colodner R., Jantunen M.E., Siitonen A., Saxen H. & Foxman B. (2002). Variations in 10 putative uropathogen

- virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. J Med Microbiol.; 51(2): 138-42.
- Marrs C.F., Zhang L. & Foxman B. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiology Letters, 252: 183-90.
  - Martineau G.P. & Almond G. (2008). Urinary tract infections in female pigs". CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3 (048): 1-9.
  - Mulvey M.A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol.; 4(5): 257-71.
  - Orden J.A., Dominguez-Bernal G., Martínez-Pulgarín S., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Blanco J. & de la Fuente R. (2007). Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. Int. Microbiol.; 10(1): 47-55.
  - Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J. & Denamur E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun.; 67(2): 546-53.
  - Raksha R., Srinivasa H. & Macaden R.S. (2003). Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. Indian J Med Microbiol.; 21(2): 102-7.
  - Roos V., Nielsen E.M. & Klemm P. (2006). Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition. FEMS Microbiol Lett.; 262(1): 22-30.
  - Tiba M.R., Yano T. & Leite Dida S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 50(5): 255-60.
  - Tóth I., Héroult F., Beutin L. & Oswald E. (2003). Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). J Clin Microbiol.; 41(9): 4285-91.
  - Wullt B., Bergsten G., Connell H., Röllano P., Gebretsadik N., Hull R. & Svanborg C. (2000). P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. Mol Microbiol.; 38(3): 456-64.

# VALIDAZIONE DI UNA SCHEDA COMPORTAMENTALE DI RILEVAZIONE DEL DOLORE NEI SUINETTI SOTTOPOSTI A CASTRAZIONE

## VALIDATION OF A BEHAVIOURAL PAIN SCALE IN PIGLETS UNDERGOING CASTRATION

ROTA NODARI S.<sup>1</sup>, GUERRA O.<sup>2</sup>, SASSI M.<sup>3</sup>, NASSUATO C.<sup>1</sup>, GASTALDO A.<sup>4</sup>, DELLA CASA G.<sup>5</sup>, ARCHETTI I. L.<sup>1</sup>, LOMBARDI G.<sup>1</sup>, CANDOTTI P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia;

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie c/o Regione del Veneto, Servizio Sanità Animale e Igiene Alimentare

<sup>3</sup>Associazione Regionale Allevatori della Lombardia

<sup>4</sup>Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia

<sup>5</sup>CRA - Unità di Ricerca per la suinicoltura, S. Cesario s.P. (MO)

**Parole chiave:** castrazione, suino, dolore, cortisolo, etologia, BPS

**Key words:** castration, pig, pain, cortisol, ethology, BPS

**Riassunto.** La valutazione del dolore negli animali rappresenta senza dubbio una grossa sfida. In questo studio abbiamo validato una scala comportamentale di dolore (BPS) in suinetti sottoposti a castrazione. Il punteggio di dolore dell'animale era dato dalla somma dei singoli punteggi di 22 diversi comportamenti per un punteggio massimo di dolore di 28.93. La scheda è stata rilevata su 500 suinetti di 20 diversi allevamenti. La BPS era internamente altamente affidabile ( $\alpha$  Cronbach= 0.88; indice di omogeneità di Greenacre = 80.73) e ha mostrato una buona correlazione con le variazioni di cortisolo post-castrazione (indice di correlazione=0.36, C.I.95% 0.15 - 0.54; n= 78 suinetti). Lo studio ha dimostrato che la BPS potrebbe essere uno strumento valido e affidabile nella misurazione del dolore nei suinetti sottoposti a castrazione.

**Abstract.** Assessing pain in animals is a great challenge. In this study, we validated a behavioral pain scale (BPS) in piglets undergoing castration. The BPS score was the sum of the scores of 22 different behaviours with a maximum score of 28.93. The scale was tested in 500 piglets of 20 farms. The BPS was internally reliable (Cronbach  $\alpha$  = 0.88; Greenacre's homogeneity index = 80.73) and well correlated with the variation of cortisol after castration (correlation index= 0.36, C.I.95% 0.15 - 0.54; n= 78 piglets). This study demonstrated that the BPS can be valid and reliable for measuring pain in piglets undergoing castration.

### INTRODUZIONE

Il dolore è un fenomeno complesso che riunisce componenti non solo sensoriali, ma anche cognitivi e affettivi. Secondo la definizione di Molony e Kent (1997) il dolore "è un'esperienza negativa dal punto di vista sensoriale ed emozionale che rende consapevole l'animale di un danno o di una minaccia all'integrità del suo organismo e determina delle modificazioni fisiologiche e comportamentali finalizzate a minimizzare o evitare ulteriori danni, diminuire la probabilità di ripetere l'esperienza dolorosa e assicurare una guarigione dai danni subiti".

Nell'uomo la misurazione del dolore viene effettuata mediante scale numeriche, visuali o verbali compilate direttamente dal paziente che sta provando l'esperienza dolorosa (Katz J and Melzack R, 1999) mentre nel neonato attraverso le scale di valutazione dell'espressione facciale, il pianto e i movimenti del corpo (Johnston CC, 1989; Larsson BA, 1999). La misurazione del dolore

negli animali è molto problematica e complessa per la mancanza di un parametro misurabile specificatamente indicativo di dolore e per l'impossibilità di misurare direttamente l'esperienza soggettiva del dolore o le emozioni suscitate da esso, rivolgendo domande direttamente al soggetto che ha sperimentato l'esperienza dolorosa o valutandone le espressioni facciali. Ne consegue la necessità di dover ricorrere all'individuazione di comportamenti e parametri fisiologici che si discostano dal normale.

La misurazione del comportamento dell'animale può fornire informazioni sul suo stato emozionale e sul fatto che un'esperienza sia stata vissuta come negativa. La presenza di comportamenti anormali come l'eccessiva vocalizzazione (Weary and Fraser, 1995; Weary et al., 1998), la postura e l'attività locomotoria (Ley et al. 1991; McGlone et al. 1993; Molony and Kent 1997; Whay 1997; McGeown et al. 1999; Thornton and Waterman-Pearson 1999), così come la riduzione di comportamenti "normali" quali ad es. l'alimentazione (Hassall et al. 1993; Rushen et al. 1993; Gentle et al. 1997) e la comparsa di comportamenti stereotipati (Zanella et al. 1996), riflettono uno scarso stato di benessere dell'animale (Gonyou 1994).

Oltre alle risposte di tipo comportamentale, uno stimolo nocicettivo determina anche alcune risposte di tipo organico e nei mammiferi, in particolare nel suino (Prunier et al., 2002), sono presenti variazioni relativamente a:

- concentrazioni ormonali in sangue, urina o saliva (CRH, ACTH, glucocorticoidi, adrenalina, noradrenalina)
- metaboliti sanguigni (glucosio, lattato, acidi grassi liberi)
- risposte neurovegetative (ritmo cardiaco, ritmo respiratorio, pressione arteriosa, temperatura corporea)
- sistema immunitario (immunoglobuline, numero e fenotipi delle cellule immunitarie).

In particolare, diversi studi hanno evidenziato un aumento di adrenalina (Prunier et al., 2002), noradrenalina (Prunier et al., 2002), lattato (Prunier et al., 2002; Prunier et al., 2005), ACTH (Prunier et al., 2002; Prunier et al., 2005) e cortisolo (Prunier et al., 2002; Prunier et al., 2005; Carrol et al., 2006) in seguito alla castrazione. Adrenalina (Prunier et al., 2002), lattato (Prunier et al., 2002; Prunier et al., 2005) e ACTH (Prunier et al., 2002; Prunier et al., 2005) aumentano molto rapidamente in prossimità della castrazione per poi tornare a livelli basali entro i 30 minuti dall'evento doloroso. Il rapido aumento di questi ormoni in seguito allo stimolo doloroso rende difficile una loro valutazione in campo su larga scala, per le ovvie difficoltà operative.

Il cortisolo ematico presenta, invece, un picco della sua concentrazione ematica tra i 30 e i 60 minuti dopo la castrazione (Prunier et al., 2005; Carrol et al., 2006) e dopo 48 ore dalla castrazione (Carrol et al., 2006).

Questo andamento del cortisolo, sebbene con picchi di entità decisamente inferiore, si osserva anche nei suinetti sottoposti esclusivamente a manipolazione (Carrol et al., 2006).

Attualmente sono in corso numerosi studi finalizzati a valutare l'efficacia di diversi trattamenti nel ridurre il dolore provato dall'animale durante la fase di castrazione, ma manca ancora uno strumento condiviso di misurazione del dolore.

L'obiettivo del presente studio era quello di creare e validare statisticamente una scheda di rilevazione comportamentale in grado di assegnare un punteggio al dolore provato dal suino al momento della castrazione.

## **MATERIALI E METODI**

### *Scheda di valutazione etologica*

Per la valutazione della presenza di una sintomatologia algica al momento della castrazione, è stata creata una scheda di rilievo comportamentale in cui sono stati riportati tutti i moduli comportamentali ritenuti al di fuori del "normale" etogramma del suinetto neonato, e che quindi

potessero essere segni di sintomatologia dolorosa. Sono state registrate anche informazioni anamnestiche e relative alle modalità operative che potrebbero in qualche modo influenzare il comportamento osservato.

La scheda è stata somministrata durante la fase di castrazione a 500 suinetti appartenenti a 20 aziende del nord Italia ed è stata successivamente utilizzata nel corso delle sessioni di castrazione svolte presso le strutture del CRA

### *Castrazione*

La castrazione è stata effettuata senza l'utilizzo di anestetici e/o analgesici mediante l'utilizzo di bisturi, in animali di età pari o inferiore ai 7 giorni di vita.

### *Prelievi ematici e titolazione del cortisolo*

Il prelievo ematico per la titolazione del cortisolo è stato effettuato su 78 soggetti. Ciascun animale è stato prelevato il giorno prima della castrazione (cortisolo basale) e tra i 30 e i 45 minuti dopo l'inizio della castrazione (picco di cortisolo). I suinetti sono stati prelevati dalla gabbia parto e riposti in carrelli riscaldati fino al momento del prelievo. Suinetti della stessa nidiata sono stati mantenuti in gruppo e non sono stati mescolati con animali appartenenti ad altre nidiate. Al momento del primo prelievo i suinetti sono stati identificati singolarmente mediante colorazione atossica e indolore a livello del dorso.

Il prelievo ematico è stato eseguito su animali in posizione di decubito dorsale con provette tipo Vacutainer® senza anticoagulante. Tutti i prelievi sono stati eseguiti il mattino tra le ore 8 e le ore 13.00. Dopo il prelievo gli animali sono stati riposti in un altro carrello riscaldato per poi essere riposti nuovamente in gabbia parto. Subito dopo il prelievo la provetta è stata messa in un contenitore refrigerato a temperatura 4-8°C e in giornata è stata consegnata al laboratorio per la processazione. Il siero è stato immediatamente separato e conservato a temperatura inferiore a -20°C.

Il cortisolo ematico è stato quantificato mediante metodica immunometrica di tipo competitivo in chemiluminescenza, con l'analizzatore automatico IMMULITE ONE (Medical System, Genova, Italia) e il kit commerciale LKC01 (Medical System, Genova, Italia), in uso presso il laboratorio di biochimica clinica e controllo qualità prodotti, animali e reagenti, IZSLER, Brescia.

### *Analisi statistica*

Per la costruzione della scala di misurazione del dolore alla castrazione si è proceduto attraverso le seguenti fasi:

1. Analisi preliminare della consistenza interna della scala e delle correlazioni item-total. In questa fase si è proceduto a calcolare la matrice di varianza e covarianza dei risultati ottenuti in fase di rilevazione dei 500 animali, da cui è stato calcolato il coefficiente di Cronbach e le correlazioni item-total come misure di coerenza degli items con la scala.
2. Calcolo delle quantificazioni ottimali delle modalità degli items. Attraverso la procedura di analisi delle corrispondenze multiple descritte da Greenacre (1993) sono state calcolate le quantificazioni ottimali degli items, sulla prima dimensione della scala.
3. Calcolo delle misure di discriminazione dei singoli items. Le quantificazioni ottimali sono state sostituite ai codici delle modalità degli items ed è stata calcolata la media delle varianze dei singoli items.
4. Valutazione dell'unidimensionalità della scala. Gli autovalori sono stati utilizzati per ottenere uno scree plot e per il calcolo del coefficiente  $\tau$  di unidimensionalità di Greenacre.
5. Ottimizzazione della scala. Sulla base delle informazioni ottenute sugli items e sull'unidimensionalità della scala, si è proceduto a ottimizzare la scala eliminando dapprima gli items con coefficiente di correlazione item-total score negativo e gli items con misure di discriminazione inferiori o uguali a 0.20.

6. Calcolo del coefficiente  $\alpha$  di Cronbach. La misura della consistenza interna della scala è stata calcolata, dopo aver verificato l'unidimensionalità della scala ottimizzata, mediante il calcolo del coefficiente  $\tau$  (utilizzando come valore soglia  $\tau > 0.50$ ), condizione necessaria per ottenere stime non distorte di  $\alpha$  di Cronbach.

Per le analisi statistiche è stato valutato l'incremento di cortisolo, pari alla differenza tra il "picco di cortisolo" e il "cortisolo basale". La relazione tra il punteggio calcolato dalla scala e i valori di cortisolo ematico è stata analizzata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione lineare.

## RISULTATI

Dopo l'eliminazione degli item con misure di discriminazione  $< 0.10$  si è ottenuta una scala costituita da 22 item (rispetto ai 143 iniziali), sulla quale si è proceduto al calcolo delle quantificazioni ottimali, alla verifica dell'unidimensionalità e al calcolo del coefficiente alpha di Cronbach. Come si rileva in figura 1 il primo autovalore spiega da solo il 30% della varianza.

La riduzione del numero degli item ha portato a un aumento dell'omogeneità della scala, quindi della sua unidimensionalità con l'alpha di Cronbach risultato pari a **0.88** e l'indice di omogeneità di Greenacre pari a **80.73**. Il punteggio massimo ottenibile, sommando i risultati ottenuti per ciascun item dopo quantificazione ottimale riscalata rispetto a quella minima, è risultato pari a **28.93**.

Di seguito sono riportati gli item eliminati nella seconda fase dell'analisi statistica per i motivi precedentemente indicati (non sono riportati i restanti item anamnestici presenti nella scheda e non correlati al dolore):

- *La reazione (tentativi di divincolamento) al 1° taglio è moderata*
- *Il suinetto al 1° taglio emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto al 1° taglio emette poche (<3) urla singole*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo è moderata*
- *Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo emette grugniti di richiamo*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 1° testicolo è moderata*
- *Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette poche (<3) urla singole*
- *Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo emette poche (<3) urla singole*
- *Il suinetto al 2° taglio emette vocalizzazioni*
- *Il suinetto al 2° taglio emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto al 2° taglio emette poche (<3) urla singole*
- *Il suinetto al 2° taglio emette urla intense e continue*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo è moderata*
- *Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo emette poche (<3) urla singole*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 2° testicolo è moderata*
- *Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette poche (<3) urla singole*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) alla aspersione del prodotto topico è moderata*
- *La reazione (tentativi di divincolamento) alla aspersione del prodotto topico è violenta*
- *Il suinetto alla aspersione del prodotto topico emette vocalizzazioni*
- *Il suinetto alla aspersione del prodotto topico emette grugniti di richiamo*
- *Il suinetto alla aspersione del prodotto topico emette poche (<3) urla singole*

- Durante la castrazione il suinetto ha evacuato feci/urina
- Durante la castrazione il suinetto è riuscito a divincolare in parte le zampe
- Durante la castrazione vi sono stati degli "intoppi" (es. necessità di ripetere il taglio, pause, ecc.)
- A castrazione avvenuta il suinetto viene deposto: nel contenitore di attesa castrazione / subito in gabbia parto

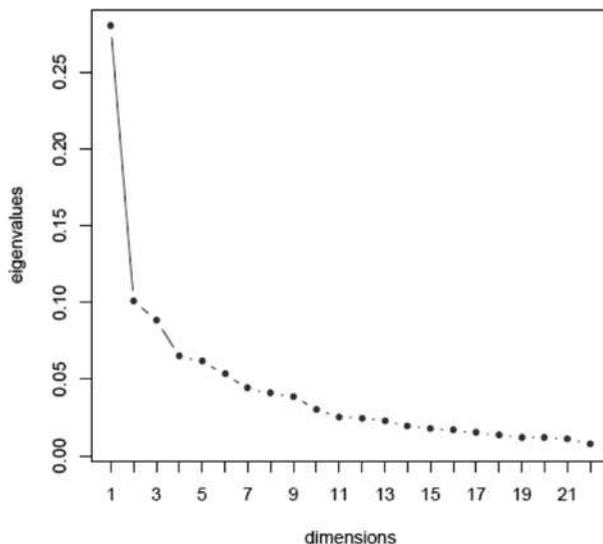
In tabella 1 sono riportati gli item selezionati mediante l'analisi statistica con il relativo punteggio e in figura 1 lo scree plot della scala dolore alla castrazione a 22 item.

**Tabella 1.** Scheda di rilevazione della risposta comportamentale durante la castrazione e punteggio attribuito alla presenza di ciascun comportamento.

**Table 1.** Behavioural form for pain during castration and score for each behavioural pattern

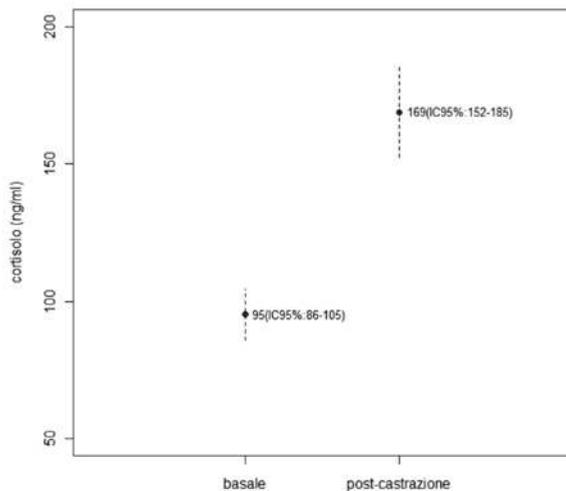
N° Item	Descrizione Item	Punteggio
1	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) al 1° taglio	0.871
2	La reazione (tentativi di divincolamento) al 1° taglio è violenta	1.180
3	Il suinetto al 1° taglio emette vocalizzazioni	1.174
4	Il suinetto al 1° taglio emette urla intense e continue	1.176
5	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo	1.260
6	La reazione (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo è violenta	1.469
7	Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo emette vocalizzazioni	1.635
8	Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 1° testicolo emette urla intense e continue	1.423
9	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 1° testicolo	1.409
10	La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 1° testicolo è violenta	1.476
11	Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette vocalizzazioni	1.521
12	Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette urla intense e continue	1.392
13	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo	1.227
14	La reazione (tentativi di divincolamento) all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo è violenta	1.575
15	Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo emette vocalizzazioni	1.290
16	Il suinetto all'estrazione ed eventuale trazione del 2° testicolo emette urla intense e continue	1.535
17	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 2° testicolo	1.319
18	La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 2° testicolo è violenta	1.630
19	Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette vocalizzazioni	1.263
20	Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette urla intense e continue	1.447
21	Il suinetto reagisce (tentativi di divincolamento) alla aspersione del prodotto topico	0.798
22	Il suinetto alla aspersione del prodotto topico emette urla intense e continue	0.857

**Figura 1.** Scree plot della scala dolore alla castrazione a 22 item  
**Figure 1.** Scree plot for pain scale (22 items) at castration

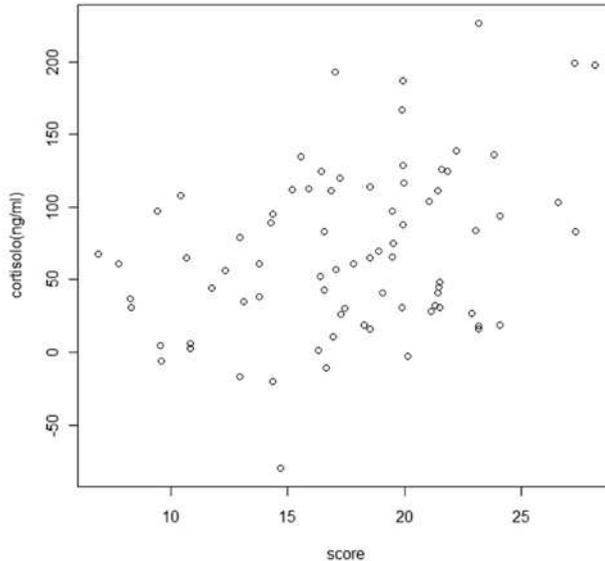


In figura 2 vengono riportati gli esiti relativi al cortisolo basale e post-castrazione.

**Figura 2.** Cortisolo basale e post-castrazione  
**Figure 2.** Basal and post castration-cortisol



Dei 78 animali esaminati, 72 hanno mostrato un aumento del cortisolo dopo la castrazione rispetto al valore basale. In figura 3 il grafico riporta sull'asse delle ordinate la differenza (incremento di cortisolo) registrata tra il valore di cortisolo in  $t_1$  (giorno della castrazione) e  $t_0$  (24 ore antecedenti l'operazione di castrazione) e sull'asse delle ascisse il punteggio calcolato sulla base delle informazioni raccolte con la scheda validata.



**Figura 3.** Incremento del cortisolo e punteggio di dolore  
**Figure 3.** Increase in cortisol and pain score

Il valore del coefficiente di correlazione lineare calcolato per i punteggi ottenuti dalla scheda e i valori di cortisolo è risultato pari a 0.36 (C.I.95% 0.15 - 0.54).

## DISCUSSIONE

L'utilizzo della scheda si basa sull'osservazione in un animale di uno o più dei comportamenti inclusi nella scheda, determinando l'attribuzione del corrispondente punteggio. La mancata osservazione del comportamento determina l'attribuzione di un punteggio pari a zero. Più comportamenti tra quelli compresi nella *rating scale* vengono osservati, più aumenta il punteggio dell'animale valutato. Il punteggio di dolore attribuito a ciascun animale deriva dalla somma del punteggio corrispondente a ciascun comportamento osservato.

Il confronto tra il punteggio ottenuto da ciascun animale rispetto al punteggio massimo ottenibile per quella scheda, può fornire indicazioni sul grado di dolore percepito dall'animale.

Il riscontro di un coefficiente alpha di Cronbach pari a 0.88 indica un'affidabilità molto elevata della scala nella misurazione della variabile latente, ovvero il dolore (Cronbach LJ, 1951). L'analisi statistica ha anche consentito di ridurre considerevolmente la numerosità degli item, migliorando l'affidabilità dello strumento attraverso la selezione degli item più informativi e fortemente correlati tra loro, quindi con una comune variabile latente (De Vellis 2006, Martinez-Martin 2009). La completa validazione della scala è stata ottenuta attraverso l'analisi di coerenza e concordanza con il cortisolo ematico, un indicatore affidabile del dolore. Nello specifico, al crescere del punteggio di dolore rilevato dalla scheda comportamentale, in caso di coefficiente di correlazione positivo si è osservato un aumento anche del cortisolo ematico. Tale rilievo è perfettamente in linea con le attese: il cortisolo ematico sale, infatti, circa 30 minuti dopo l'evento doloroso o stressante, per poi scendere nuovamente ai livelli basali nell'ora successiva. È, quindi, congrua alle attese una correlazione positiva tra il rilievo comportamentale durante la manualità dolorosa e il relativo picco ematico in cortisolo per quell'evento specifico.

Come già evidenziato dalla bibliografia, il cortisolo aumenta in relazione a eventi dolorosi ma non unicamente in associazione a essi, non essendo un ormone specifico per il dolore. La correlazione evidenziata tra incremento di cortisolo e punteggio calcolato dalla BPS pari al 36% e non superiore era pertanto attesa.

## **CONCLUSIONI**

Il parere degli autori è che la scheda, auto validata dagli elevati valori dell'alfa di Cronbach e positivamente correlata al cortisolo ematico, sia in grado di misurare in modo reale una situazione algica nei suinetti castrati e non stia misurando altri eventi. La scheda rappresenta pertanto un valido strumento per la misurazione del dolore durante la castrazione e può rappresentare uno strumento particolarmente utile per le prove sperimentali nelle quali si voglia confrontare l'efficacia nella riduzione del dolore alla castrazione di diverse molecole o tecniche di esecuzione.

Si ringraziano gli allevatori, rappresentati dalla Sezione Regionale Allevatori di Suini dell'ARAL, che hanno manifestato la volontà di eseguire l'attività di ricerca, concretizzata da ARAL attraverso l'adesione al bando per la Ricerca in agricoltura della Regione Lombardia e l'attuazione operativa, partecipata anche da tecnici delle APA lombarde, con la collaborazione di IZSLER.

IL PRESENTE LAVORO RIPORTA I RISULTATI PRELIMINARI DEL PROGETTO DI RICERCA IN ITINERE  
“MISURA E RIDUZIONE DEL DOLORE DA CASTRAZIONE NEI SUINETTI (MI.RI.DO. C.A.S.)”

FINANZIATO DA:

REGIONE LOMBARDIA

DELIBERA DI GIUNTA REGIONALE DEL 02 APRILE 2008, N. 6924:

PROGETTI FINANZIABILI SECONDO I CRITERI PREVISTI DAL

PROGRAMMA REGIONALE DI RICERCA IN CAMPO AGRICOLO 2007-2009.

ENTE PROPONENTE: ASSOCIAZIONE REGIONALE ALLEVATORI DELLA LOMBARDIA (ARAL)

ASSESSORATO AGRICOLTURA REGIONE EMILIA ROMAGNA

SECONDO LE DIRETTIVE PREVISTE DALLA L.R. 28/98 - P.S.A. 2008

ENTE PROPONENTE: CENTRO RICERCHE PRODUZIONI ANIMALI (CRPA)

## **BIBLIOGRAFIA**

Carrol JA, Berg EL, Strauch TA, Roberts MP, Kattesh HG (2006) Hormonal profiles, behavioral responses and short-term growth performance after castration of pigs at three, six, nine or twelve days of age. *J. Anim. Sci.* 84(5), 1271-1278.

Cronbach LJ (1951) Coefficient alpha and the internal structure of tests. *Psychometrika* 16:297-334.

De Vellis RF (2006) Classical test theory. *Med Care* 44, 11 Suppl 3, S50-9.

Gentle MJ, Hunter LN, Corr SA (1997) Effects of caudolateral neostriatal ablations on pain-related behaviour in the chicken. *Physiol. Behav.* 61 (4), 493-498.

Gonyou HW (1994) Why the study of animal behaviour is associated with the animal welfare issue. *J. Anim. Sci.* 72 (8), 2171-2177.

Greenacre MJ (1993) Correspondence analysis in practice. London: Academic Press Limited.

Hassall SA, Ward WR, Murray RD. (1997). Effects of lameness on the behaviour of cows during the summer. *Vet Rec.* 5; 132(23): 578-80.

Katz J, Melzack R. (1999). Measurement of pain. *Surg Clin North Am.* 1999 Apr;79(2):231-52.

Johnston C.C. (1989) Pain assesment and management in infants. *Pediatrician*, 16: 16-23.

Larsson BA (1999) Pain management in neonates. *Acta Pædiatr* 88: 1301-10.

Ley SJ, Livingston A, Waterman AE (1991) Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep. *Vet. Rec.* 129 (3), 45-47.

Martinez-Martin P (2009) Composite rating scales. *J.Neurol.Sci.* doi:10.1016/j.jns.2009.08.013.

McGeown D, Danbury TC, Waterman-Pearson AE, Kestin SC (1999) Effect of carprofen on lameness in broiler chickens. *Vet. Rec.* 144 (24), 668-671.

McGlone JJ, Nicholson RI, Hellman JM, Herzog DN (1993) The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration induced behavioral changes. *J. Anim. Sci.* 71 (6), 1441-1446.

Molony V, Kent JE (1997) Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.* 75 (1), 266-272.

Nunnally JC, Bernstein IH (1994) *Psychometric Theory*. New York: McGraw-Hill.

Prunier A, Hay M, Servière J (2002) Evaluation et prévention de la douleur induite par les interventions de conenance chez le porcelet. *Journées de la Recherche Porcine*, 34, 257-268.

Prunier A, Mounier AM, Hay m (2005) Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stresshormones in young pigs, *J. Anim. Sci.* 83(1), 216-222.

Rushen J, Foxcroft G, DePassille AM (1993) Nursing-induced changes in pain sensitivity, prolactin and somatotropin in the pig. *Physiol. Behav.* 53 (2), 265-270.

Thornton PD, Waterman-Pearson AE (1999) Quantification of the pain and distress responses to castration in young lambs. *Res. Vet. Sci.* 66 (2), 107-118.

Weary DM, Fraser D (1995) Signalling need - costly signals and animal welfare assessment. *App. Anim. Behav. Sci.* 44 (2-4), 159-169.

Weary DM, Braithwaite LA, Fraser D (1998) Vocal responses to pain in piglets. *App. Anim. Behav. Sci.* 56 (2-4), 161-172.

Whay HR (1997) Pain in the lame cow. *Vet. Rec.* 50 (10), 603-609.

Zanella AJ, Broom DM, Hunter JC, Mendl MT (1996) Brain opioid receptors in relation to stereotypies, inactivity, and housing in sows. *Physiol. Behav.* 59 (4-5), 769-775.

# EFFETTO DELL'ETÀ E DEL SESSO SU ALCUNI PARAMETRI EMATICI CORRELATI ALLO STRESS IN SUINI PESANTI ALL'INGRASSO

## AGE AND GENDER EFFECT ON SOME BLOOD PARAMETERS RELATED TO STRESS IN FATTENING HEAVY PIGS

DI MARTINO G.<sup>1</sup>, STEFANI A.<sup>1</sup>, GOTTARDO F.<sup>2</sup>, SCOLLO A.<sup>2</sup>, SCHIAVON E.<sup>1</sup>, CAPELLO K.<sup>1</sup>, BONFANTI L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova*

**Parole chiave:** età, genere, suino pesante, aptoglobina, cortisolo, rapporto albumina globuline.  
**Key words:** age, gender, heavy pig, haptoglobin, cortisol, albumin to globulin ratio.

**Riassunto.** In un sito di ingrasso di suini commerciali per la produzione del suino pesante italiano è stato monitorato un ciclo di 210 giorni di 366 maschi castrati e 366 femmine. Sono stati quantificati attraverso 2 prelievi ematici a 122 e 274 giorni di età, ciascuno su 72 maschi castrati e 72 femmine, i livelli sierici di aptoglobina, albumina, globuline e cortisolo. I parametri considerati non hanno evidenziato chiari effetti correlati all'aumento dell'età degli animali e non hanno superato valori considerati fisiologici. I soggetti di sesso femminile hanno evidenziato a fine ingrasso valori di aptoglobina statisticamente superiori rispetto ai maschi castrati, non correlati all'innalzamento degli altri parametri di stress: ciò sembra essere dovuto alla presenza di un effetto sesso in tale sieroproteina non legato allo stress. La quantificazione della pig-MAP, inizialmente inserita nel protocollo di monitoraggio, è stata poi esclusa a causa di una insufficiente ripetibilità e riproducibilità del metodo seguito.

**Abstract.** A fattening cycle of 210 days of 366 castrated males and 366 females for the production of Italian heavy pig was monitored into an open-site commercial farm. Serum haptoglobin, albumin, globulins and cortisol level were quantified through 2 blood sampling at 122 and 274 days of age, each one on 72 castrated males and 72 females. Analysed parameters didn't highlight clear effect related to animal age and didn't exceed values considered physiological. Females evidenced haptoglobin values statistically higher than males at the end of the fattening period, not related to the increase of the other stress parameters: this fact seems to be due to the presence of a gender effect in this seroprotein not linked to stress. Pig-MAP quantification, at the first instance enclosed in the monitoring protocol, was then excluded because of unacceptable reproducibility and repeatability characteristics of the adopted method.

### INTRODUZIONE

Nella valutazione del benessere della specie suina stanno riscuotendo interesse crescente quei parametri di tipo fisiopatologico che possono rivelarsi non solo marker precoci dell'insorgenza di patologie (esprimibili in termini di flogosi subclinica), ma anche indicatori di condizioni di allevamento non adeguate.

L'aptoglobina (Hp), ad esempio, è una glicoproteina la cui funzione primaria è quella di legare l'emoglobina libera nel sangue (Kaneko, 2008), ma è anche stata riconosciuta come la principale proteina di fase acuta (AAP) nei ruminanti (incremento di 10-100 volte in

risposta allo stimolo) e nel suino (incremento di 2-10 volte) (Murata *et al.*, 2004). In questa specie l'aumento di Hp è stato dimostrato essere associato a segni clinici di patologie podali e respiratorie, morsicatura delle code, necrosi delle orecchie, lesioni croniche rilevate in fase di macellazione (Petersen *et al.*, 2004; Salamano *et al.*, 2008; Heinonen *et al.*, 2010). Anche la pig-MAP secondo studi recenti sembra essere, assieme all'aptoglobina, un altro promettente parametro indicatore di stress, in quanto mostra aumenti anche di più di 10 volte nel corso flogosi iatrogene, traumi e infezioni (Piñeiro *et al.*, 2009).

L'albumina (Alb) rappresenta la componente maggiore delle proteine plasmatiche, è essenziale per regolazione e mantenimento della pressione colloidale-osmotica del sangue ed è coinvolta nel trasporto di metaboliti. E' sintetizzata nel fegato e la sua concentrazione plasmatica può risultare diminuita nel corso di epatopatie, nefropatie, parassitosi e patologie infiammatorie croniche (Kaneko *et al.*, 2008). La frazione delle globuline (Glo) va incontro ad un aumento in presenza di patologie infettive e processi infiammatori, ad una diminuzione nel corso di stati immunodepressivi (Kaneko *et al.*, 2008). Il rapporto albumina/globuline (rapporto A/G) risulta pertanto un importante parametro fisiologico di stress, in quanto il suo decremento è spesso associato a patologie infiammatorie e rappresenta la cosiddetta risposta di fase acuta (Kaneko *et al.*, 2008).

Il livello di cortisolo sierico, pur presentando notevoli variazioni in base al ritmo circadiano, con picchi massimi nel pomeriggio (Evans *et al.*, 1988), è un ormai consolidato parametro di valutazione di condizioni di stress nel suino, essendo il principale glucocorticoide secreto (Bottoms *et al.*, 1972). Studi più recenti che hanno indagato maggiormente la sua concentrazione salivare hanno evidenziato variazioni legate anche all'età e al genere (Ruis *et al.*, 1997).

Le informazioni relative alle condizioni di stress subito dai suini che sono ricavabili dai suddetti parametri devono tuttavia essere valutate in base a intervalli di riferimento che considerino il genere e l'età degli animali, aspetti potenzialmente rilevanti in relazione alla biochimica clinica ancora poco studiata del suino pesante italiano. L'obiettivo di questo lavoro è stato pertanto quello di individuare dei valori medi per alcuni parametri ematici in relazione al sesso e alla fase di ingrasso.

## **MATERIALI E METODI**

### *Animali e strutture*

La ricerca, della durata di 30 settimane, ha impiegato 672 suini ibridi commerciali (366 maschi castrati e 366 femmine) provenienti dallo stesso sito di svezzamento ed accasati a 80 giorni di età presso il medesimo capannone di ingrasso in 24 box unisessuali di 28 capi con pavimentazione in cemento parzialmente grigliato (28.6 m<sup>2</sup>), più parquet esterno in grigliato. L'alimentazione era di tipo liquido in un trogolo di lunghezza tale da garantire 40 cm/capo. L'acqua di bevanda era sempre a disposizione degli animali attraverso la presenza di un abbeveratoio per ogni box. Ciascun box presentava inoltre quali arricchimenti ambientali una catena in metallo e una ricoperta da gomma. Il controllo sanitario degli animali veniva effettuato 2 volte al giorno da personale adeguatamente formato in corrispondenza della distribuzione dei pasti.

### *Prelievi ematici e metodiche di laboratorio*

I prelievi sono stati effettuati a 122 e 274 giorni di età dei suini. Da ciascun box sono stati scelti casualmente 6 capi, effettuando quindi complessivamente 72 prelievi tra i maschi castrati e 72 tra le femmine in corrispondenza di ciascuna età. Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare utilizzando provette sottovuoto da 10 ml (Vacutest Kima srl, Arzègrande, PD, Italia). Il siero è stato ottenuto attraverso centrifugazione a 2500g per

10 minuti a 20°C.

La concentrazione di Hp sierica è stata determinata attraverso kit commerciale ELISA (Phase Haptoglobin, Tridelata Development Ltd, Maynooth, County Kildare, Irlanda), sulla base del metodo proposto da Petersen *et al.* (2001). La percentuale delle frazioni proteiche è stata determinata attraverso elettroforesi automatizzata (Hydrasis LC, SEBIA, EVRY Cedex, Francia) su gel di agarosio allo 0,8% (Hydrigel 30 Protein, SEBIA, EVRY Cedex, Francia). Per determinare la concentrazione di albumina e globuline le proteine totali del siero sono state quantificate con analizzatore automatizzato (BM Hitachi 911, ROCHE, Basel, Svizzera) attraverso kit colorimetrico con reagente di Biuretto (TP, ROCHE, Basel, Svizzera).

Il cortisolo è stato determinato mediante metodica immunologica in chemiluminescenza utilizzando un kit commerciale applicato a strumentazione automatizzata Immunlite One (Medical System, Italia).

La pig-MAP è stata valutata attraverso il metodo proposto da Piñeiro M. *et al.* (2009) utilizzando un kit ELISA (PigMAP kit ELISA, PigCHAMP Pro Europa S.A.).

#### *Analisi statistica dei dati*

E' stata valutata la normalità delle distribuzioni dei parametri osservati tramite il test di Saphiro-Francia e si è proceduto alla normalizzazione dei dati nei casi in cui l'assunto non era verificato. L'elaborazione statistica è stata condotta attraverso un'analisi della varianza per modelli misti, separatamente per momento di prelievo e considerando il box come effetto random. I dati sono presentati come media e deviazione standard. L'analisi è stata realizzata utilizzando il software statistico STATA versione 9.2.

## **RISULTATI**

Nonostante l'accuratezza con cui è stato effettuato il prelievo, un numero seppur esiguo di campioni di siero ha presentato un evidente stato di emolisi, venendo quindi escluso dal data set. Tale fenomeno potrebbe infatti inficiare la quantificazione di diversi parametri, tra cui la stessa Hp come è stato evidenziato da Petersen *et al.*, 2001.

La percentuale di campioni eliminati è stata quindi pari all'8.3% a 122 giorni mentre è stata dell'1.4% a 274 giorni.

In tabella 1 sono riportati i dati medi dei diversi parametri considerati stratificati per sesso ed età. A 122 giorni non si sono registrate differenze significative nella concentrazione di Hp tra maschi castrati e femmine. A 274 giorni le femmine presentano concentrazioni quasi due volte superiori rispetto ai maschi, pur rimanendo all'interno del *range* fisiologico indicato da Kaneko, *et al.* (2008).

I livelli medi di albumina sierica, globuline totali e rapporto A/G, stratificati per sesso ed età, non differiscono in modo significativo tra maschi castrati e femmine nei 2 prelievi. I valori di albumina ricadono nell'intervallo riportato da Kaneko *et al.* (2008), mentre le globuline mostrano valori complessivi lievemente inferiori rispetto al *range* proposto dallo stesso autore, ma sono maggiori di quelli misurati da Hicks *et al.* (1998) durante la fase di svezzamento.

Analogamente a quanto osservato per le frazioni proteiche del siero, i livelli medi di cortisolo stratificati per sesso ed età non evidenziano differenze tra gruppi nei due prelievi. In media i valori ricadono entro l'intervallo fisiologico (27-355 nmol/l) riportato da Kaneko *et al.* (2008).

La concentrazione di PigMAP sierica non è stata determinata a causa di valori di ripetibilità ( $n = 20$ ,  $CV > 20\%$ ) e riproducibilità ( $n = 10$ ,  $CV > 20\%$ ) troppo elevati ottenuti utilizzando il metodo ELISA: tali caratteristiche non consentono di confermare la validazione della metodica secondo i dati pubblicati in letteratura.

**Tabella 1.** Concentrazione sierica (media e deviazione standard) di Hp, Alb, Globuline (g/l), rapporto A/G e cortisolo in suini all'ingrasso maschi castrati e femmine a 122 e 274 giorni di età.

**Table 1.** Serum concentration (mean and standard deviation) of Hp(mg/dl), Alb(g/l), Globulins (g/l), A/G ratio and cortisol (nmol/l) in fattening castrated males and females at 122 and 274 days of age.

Parametro	Sesso	Età	
		122	274
Hp (mg/dl)	Maschi castrati	77.6 (±52.0)	43.7 (±44.5) <sup>B</sup>
	Femmine	78.0 (±53.3)	106.6 (±60.2) <sup>A</sup>
Alb (g/l)	Maschi castrati	25.65 (±2.7)	27.98 (±2.7)
	Femmine	26.6 (±2.6)	28.85 (±2.7)
Glo (g/l)	Maschi castrati	37.1 (±4.4)	37.22 (±4.2)
	Femmine	34.6 (±4.5)	38.04 (±4.0)
A/G	Maschi castrati	0.71 (±0.1)	0.77 (±0.1)
	Femmine	0.78 (±0.1)	0.76 (±0.1)
Cortisolo (nmol/l)	Maschi castrati	55.02 (±25.1)	64.04 (±33.2)
	Femmine	50.73 (±24.2)	64.89 (±42.1)

Lettere diverse in apice indicano differenze per  $P < 0.001$

## DISCUSSIONE

Gli elevati livelli di emolisi 122 giorni, seppur confrontabili con quelli ottenuti da Rota Nodari *et al.*, 2009, (3 campioni scartati su 41, ovvero il 7%), sono stati successivamente molto contenuti attraverso una maggiore efficienza nel contenimento degli animali, campionamento e processazione entro le 2 ore dal prelievo. Queste attenzioni sono comunque a conferma del fatto che la fase di prelievo rappresenta nella specie suina un notevole punto critico per l'idoneità del campione ematico (Rota Nodari *et al.*, 2009), a causa della fragilità eritrocitaria più elevata rispetto alle altre specie domestiche (Oyewale, 1992). Un approfondimento relativo ai fattori che contribuiscono all'emolisi (soggetto, sesso, tipo di stabulazione ecc.) può essere importante anche in relazione alle possibili correlazioni tra stress e aumento della fragilità eritrocitaria, come dimostrato da Adenkola *et al.*, 2010.

Considerando i valori di Hp, questi rimangono nel corso della prova entro i limiti riportati in letteratura da diversi autori. Petersen *et al.* (2001) hanno trovato valori medi di  $76 \pm 52$  mg/dl, Clapperton *et al.* (2005) a 168 giorni hanno indicato  $101 \pm 42$  mg/dl per i maschi castrati e  $110 \pm 31$  mg/dl per le femmine, Piñeiro *et al.* (2009) a 140 giorni di età hanno riportato valori medi di  $89 \pm 86$  mg/dl, infine Heinonen *et al.* (2010) in suini a fine ingrasso hanno trovato valori variabili di 90-150 mg/dl. Un certo grado di variabilità nei risultati ottenuti dai diversi lavori potrebbe derivare dall'utilizzo di differenti metodiche di laboratorio, che consente una comparazione solo approssimativa dei dati (Eckersall *et al.*, 1999). In riferimento ai dati

riportati bisogna inoltre sottolineare che sono quasi sempre relativi a pochi soggetti, talora senza distinzione in base al genere e provenienti da particolari situazioni sperimentali. Il presente studio, rispetto a quelli citati, è stato impostato su un numero rilevante di soggetti ed in un ben definito contesto produttivo, ma ha comunque confermato la grande variabilità del parametro in oggetto.

Nonostante sia chiara l'influenza delle alterazioni patologiche nella concentrazione di aptoglobina nei suini (Petersen *et al.*, 2004; Salamano *et al.*, 2008; Heinonen, 2010), pochi lavori hanno indagato gli effetti legati alle diverse condizioni fisiologiche. Richter *et al.* (1974), hanno rilevato un aumento della concentrazione di aptoglobina nei primi 50 giorni di vita dei suini e valori significativamente più bassi nei verri rispetto alle scrofe, mentre non sono state evidenziate differenze significative tra maschi castrati e femmine all'ingrasso. Lipperheide *et al.* (1998) e Petersen *et al.* (2002) confermano i risultati di Richter *et al.* (1974) per quanto riguarda la fase di ingrasso, ma sottolineano che l'aumento dei livelli nel tempo sembrerebbe essere legato ad un incremento dei livelli di stress derivanti dalle condizioni di stabulazione piuttosto che ad un effetto età fisiologico. Clapperton *et al.* (2005) non evidenziano alcun effetto età, ma valori significativamente più alti nelle femmine rispetto ai maschi castrati a 126 giorni di vita che non sono più riscontrabili a 168 giorni. Piñeiro *et al.* (2009) evidenziano un aumento del livello in 10 suini (5 maschi e 5 femmine) campionati in modo casuale a 21, 56, 112 e 140 giorni di vita e confermano valori più bassi in 20 verri rispetto a 45 scrofe (94 vs. 147 mg/dl).

I valori significativamente più alti nelle femmine non trovano esatta corrispondenza con i dati di letteratura per quanto riguarda la fase di ingrasso, anche se non è irrilevante la durata del ciclo di allevamento, in quanto i lavori che hanno investigato sulle variazioni di Hp si riferiscono a suini leggeri. Se consideriamo invece i lavori prodotti su scrofe e verri, le femmine presentano valori più elevati di Hp. Le differenze riscontrate nel presente lavoro potrebbero essere collegate ai cambiamenti ormonali fisiologici indotti dal raggiungimento della maturità sessuale, come già ipotizzato da Clapperton *et al.* (2005), piuttosto che a specifiche condizioni di stress, dato che gli altri indicatori fisiologici di stress misurati a 274 giorni (rapporto A/G e cortisolo) rientrano nei *range* di normalità e non evidenziano differenze.

## **CONCLUSIONI**

Non si sono evidenziati chiari effetti legati all'età e al sesso per quanto riguarda i valori sierici di albumine, globuline, rapporto A/G e cortisolo.

Nonostante la correlazione tra Hp ed età degli animali non sia ancora pienamente chiarita, è rilevante il fatto che vi sia nel suino pesante un marcato effetto legato al sesso, che a 274 giorni di vita avvicina la fisiologia di questa categoria produttiva a quella di scrofe e verri, pur essendo i maschi in ingrasso soggetti a castrazione. Tale aspetto dovrà essere tenuto in considerazione in corso di monitoraggi di questo parametro non bilanciati in tal senso.

## **RINGRAZIAMENTI**

Questo lavoro fa parte di un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Veneto U.P. Sanità Animale e Igiene Alimentare, in collaborazione con Ulss 8 di Asolo.

L'attività di campo è stata possibile grazie alla disponibilità della Ditta Veronesi.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Adenkola A.Y., Ayo J.O., Sackey A.K.B., Adelaiye A.B. (2010) "Erythrocyte osmotic fragility of pigs administered ascorbic acid and transported by road for short-term duration during the harmattan season". *African J. Biotech.* 9, 226-233.
- Bottoms GD, Roesel O.F., Rausch F.D., Akins E.L. (1972) "Circadian variation in plasma

cortisol and corticosterone in pigs and mares”. *Am. J. Vet. Res.* 33, 785–790.

Clapperton M., Bishop S.C., Cameron N.D., Glass E.J. (2005) “Association of acute phase protein levels with growth performance and with selection for growth performance in Large White pigs”. *Animal Science* 81, 213-220.

Eckersall P.D., Duthie S., Toussainte M.J.M., Gruys E., Heegaard P., Alawa M., Lipperheide C., Madec F. (1999) “Standardisation of diagnostic assays for animal acute phase proteins”. *Adv. Vet. Sd. Comp. Med* 41, 643-655.

Evans F.D., Christopherson R.J. Aherne F.X. (1988) “Development of the circadian rhythm of cortisol in the gilt from weaning until puberty”. *Can. J. Anim. Sci.* 68, 1105–1111.

Heinonen M., Orro T., Kokkonen T., Munsterjelm C., Peltoniemi O. (2010) “Tail biting induces a strong acute phase response and tail-end inflammation in finishing pigs”. *Vet. J.* 184, 303-307.

Hicks T.A., McGlone J.J., Whisnant C.S., Kattesh H.G., Norman R.L. (1998) “Behavioral, Endocrine, Immune, and Performance Measures for Pigs Exposed to Acute Stress”. *J. Anim. Sci.* 76, 474–483.

Kaneko J.J. (2008). “Clinical biochemistry of domestic animals”. 6th ed. Academic Press, San Diego, California.

Lipperheide C., Diepers N., Lampreave F., Alava M., Petersen B. (1998) “Nephelometric determination of haptoglobin plasma concentrations in fattening pigs”. *J. Vet. Med. A* 45, 545-550.

Murata H., Shimada N., Yoshioka M. (2004) “Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview”. *Vet. J* 168, 28–40.

Oyewale J.O. (1992) “Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variations in temperature and pH”. *J. Vet. Med.* 39, 98- 104.

Petersen H.H., Nielsen J.P., Jensen A.L., Heegaard P.M.H. (2001) “Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of porcine haptoglobin”. *J. Vet. Med. A* 48, 513–523.

Petersen H.H., Ersbøll A.K., Jensen C.S, Nielsen J.P. (2002) “Serum-haptoglobin concentration in Danish slaughter pigs of different health status”. *Prev. Vet. Med.* 54, 325–335.

Petersen, H. H., J. P. Nielsen, and P. M. H. Heegard 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Rev. Res.* 35, 163-187.

Piñeiro C., Piñeiro M., Morales J., Andrés M., Lorenzo E., del Pozo L., Alava M.A., Lampreave F. (2009) “Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms”. *Vet. J.* 179, 78-84.

Piñeiro M., Lampreave F., Alava M.A. (2009). “Development and validation of an ELISA for the quantification of pig Major Acute phase Protein (Pig-MAP)”. *Vet. Imm. Immunopathol.* 127, 228-234.

Richter H. (1974) “Haptoglobin bei haussäugetieren. III. Mitteilung: der haptoglobingehalt im blutplasma under serum von widerkäuern und sweenen unter verschiedenen physiologischen bedingungen”. *Arch. Exp. Der. Med.* 28, 505–519.

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: effect of age, gender and stress. *Physiology and Behaviour* 62, 623-630.

Rota Nodari S., Archetti I., Guerra P., Candotti P. (2009) “Intervalli di riferimento di alcuni parametri biochimici in scrofe.” In: “Atti della società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini”. XXXV Meeting annuale, Modena 12-13 marzo 2009, 199-206.

Salamano G., Mellia E., Candiani D., Ingravalle F., Bruno R., Ru G., Doglione L. (2008) “Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine”. *Vet. J.* 177, 110-115.

# PROPOSTA DI UN PIANO D'AZIONE PER LA SOPPRESSIONE DEL SUINO IN ALLEVAMENTO

## PROPOSAL OF AN ON FARM KILLING ACTION PLAN FOR PIGS

CANDOTTI P. <sup>1</sup>, ROTA NODARI S. <sup>1</sup>, DIEGOLI G. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia

<sup>2</sup>AUSL Bologna, Area Igiene degli Allevamenti e Produzioni Animali

**Parole chiave:** suino, soppressione, pistola a chiodo captivo, benessere animale

**Key words:** pig, killing, captive bolt gun, animal welfare

**Riassunto.** Vengono prese in esame le caratteristiche delle diverse tecniche utilizzabili per la soppressione del suino in allevamento. Sulla base dell'economicità e praticabilità, lo stordimento mediante pistola a proiettile captivo penetrante (suini di peso >5kg) e il trauma cranico da percussione (suini <5kg) seguiti da jugulazione vengono ritenute le tecniche migliori effettuabili in campo. Viene proposto anche un algoritmo decisionale.

**Abstract.** The Authors review different methods for the on farm euthanasia of pigs. Captive bolt stunning (pigs weighting >5kg) and blunt trauma (pigs <5kg) followed by exanguination are identified as the most suitable techniques to apply in field. A decision algorithm for euthanasia is also proposed.

### INTRODUZIONE

Per l'operatore di allevamento è necessario avere diverse competenze tecniche che gli permettano di gestire al meglio le strutture e le attrezzature aziendali e gli animali allevati. Oltre alle conoscenze di base di fisiologia, etologia, nutrizione e alimentazione (D.Lgs 146/2001), è a parere nostro, necessario che l'operatore acquisisca anche competenze teoriche e pratiche sulle migliori metodiche di abbattimento degli animali in azienda. L'induzione volontaria della morte di un animale è, infatti, una pratica che, se mal eseguita può comportare grave stress, angoscia e dolore nell'animale. Sebbene si tratti di un evento circoscritto, con una durata temporale sicuramente non paragonabile al trasporto o all'allevamento, il suo impatto sul benessere animale è sicuramente elevato. È pertanto importante istruire le maestranze affinché questo atto sia compiuto secondo le più aggiornate conoscenze scientifiche affinché l'abbattimento dell'animale possa divenire una "buona morte".

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare un *action plan* per l'eutanasia dei suini in allevamento sulla base delle tecniche disponibili e della relativa normativa.

### MATERIALI E METODI

Di seguito vengono prese in esame, oltre la normativa relativa al benessere degli animali, le caratteristiche dei diversi sistemi di stordimento-abbattimento, nonché le situazioni che portano alla scelta di eliminare l'animale.

#### *Normativa*

L'abbattimento degli animali è attualmente regolato dal D.Lgs. 1-9-1998 n. 333, attuazione della direttiva 93/119/CE relativa alla protezione degli animali durante la macellazione o l'abbattimento, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale del 28 settembre 1998, n. 226. Tale decreto ammette come metodi di stordimento: pistola a proiettile captivo; 2 commozione

cerebrale; elettroanestesi; esposizione al biossido di carbonio, mentre come metodi di abbattimento: pistola o fucile a proiettile libero; elettrocuzione; esposizione al biossido di carbonio.

Tale decreto sarà in vigore solo fino al 31 dicembre 2012, poiché a partire dal 1° gennaio 2013 entrerà in vigore il Regolamento CE 1099/2009. In tabella 1 sono riportati i metodi per l'abbattimento ammessi da tale regolamento.

**Tabella 1.** *Elenco dei metodi ammessi per l'abbattimento (a) e lo stordimento (s)*  
**Table 1.** *List of killing (a) and stunning (s) methods*

<b>Metodo</b>	<b>Categorie di suini</b>
<b>Dispositivo a proiettile captivo penetrante (s)</b>	Tutte
<b>Arma a proiettile libero (a)</b>	Tutte
<b>Colpo da percussione alla testa (a)</b>	Suinetti < 5 kg
<b>Elettroanestesi con applicazione limitatamente alla testa (s)</b>	Tutte
<b>Elettrocuzione (applicazione di corrente testa e corpo) (a)</b>	Tutte
<b>Esposizione a gas (a, s):</b>	
– <b>Biossido di carbonio ad alta concentrazione</b>	Tutte
– <b>Biossido di carbonio associato a gas inerti</b>	
– <b>Gas inerti</b>	
<b>Esposizione a gas (a):</b>	
– <b>Monossido di carbonio</b>	Suinetti*
– <b>Monossido di carbonio associato ad altri gas</b>	
<b>Iniezione letale</b>	Tutte

\*Ai sensi dell'art.2 del D.Lgs. 30 dicembre 1992, n.534 per suinetto si intende un suino dallo svezzamento all'età di 10 settimane.

#### *Caratteristiche dei diversi sistemi di abbattimento*

Nella scelta del metodo di abbattimento dell'animale, è importante prendere in considerazione le diverse caratteristiche di ciascuna metodologia e in particolare:

- la sicurezza per l'operatore: il metodo non deve sottoporre gli operatori a inutili rischi per la loro incolumità,
- benessere del suino: il metodo deve ridurre al minimo il rischio che l'animale possa andare incontro a dolore o stress,
- abilità richieste: il metodo dovrebbe essere facile da apprendere e ripetibile,
- costo: il metodo dovrebbe essere economico per l'allevatore,
- estetica (livello di sgradevolezza per l'osservatore): il metodo non dovrebbe essere sgradevole per la persona che lo esegue e per eventuali osservatori,
- limiti: alcuni metodi sono adatti esclusivamente a talune categorie di animali e in strutture con particolari attrezzature.

In tabella 2 vengono esaminate in modo specifico queste caratteristiche per i diversi metodi eutanasci.

**Tabella 2.** *Caratteristiche specifiche di diversi metodi eutanasci in caso di corretta applicazione.*

**Table 2.** *Specific characteristics of different euthanasia methods if they are correctly applied.*

	<b>Rischio per la sicurezza dell'operatore</b>	<b>Benessere del suino</b>	<b>Abilità richiesta</b>	<b>Costo</b>	<b>Estetica</b>	<b>Limiti</b>
<b>CO2</b>	basso, ma effettuabile solo in aree ben ventilate	mediocre	bassa	medio: – acquisto iniziale dell'apparecchiatura – acquisto CO2	mediocre	necessaria apparecchiatura e autorizzazione detenzione gas tecnici
<b>Sparo con arma libera nella regione cerebrale, seguita da jugulazione</b>	alto	elevato	elevata	moderato: – acquisto iniziale dell'arma	mediocre	-necessario training e abilità, -non adatto a suini di piccole dimensioni (rischio di mancare il bersaglio)
<b>Proiettile captivo penetrante seguito da jugulazione</b>	moderato	buono	media	moderato: acquisto iniziale dell'arma	mediocre	-necessario training e abilità, -non adatto a suini di piccole dimensioni
<b>Elettronarcosi (solo testa) seguita da jugulazione</b>	basso se utilizzate apparecchiature commerciali	elevato	bassa	moderato: acquisto iniziale dell'apparecchiatura	mediocre	necessaria apparecchiatura specifica
<b>Elettronarcosi (solo testa) seguita induzione di fibrillazione cardiaca</b>	basso se utilizzate apparecchiature commerciali	elevato	bassa	moderato: acquisto iniziale dell'apparecchiatura	buona	necessaria apparecchiatura specifica
<b>Overdose di anestetico</b>	basso (effettuato dal medico veterinario)	ottimo (correlato alla contenzione)	alta	alto	buona	effettuabile solo dal medico veterinario
<b>Percussione violenta alla testa seguita da jugulazione</b>	molto basso	buono	elevata	molto basso	molto scarsa	solo per suini di piccole dimensioni

In seguito all'analisi delle caratteristiche dei diversi metodi disponibili, si ritiene che quelli più idonei ad un utilizzo in allevamento siano:

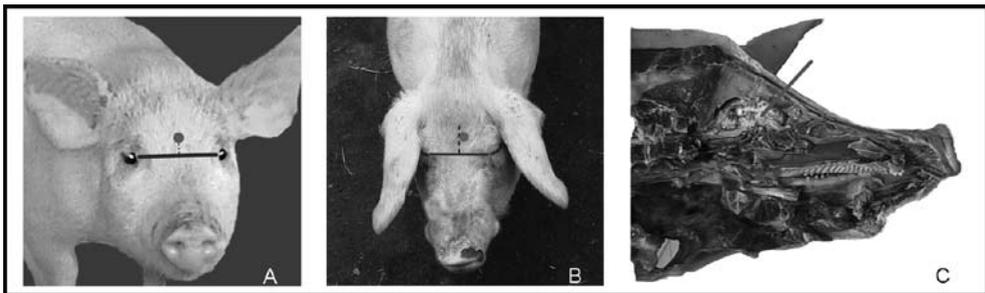
#### *Suini > 5kg*

Il metodo senza dubbio più praticabile in allevamento sia per la sua economicità che per la semplicità di utilizzo è lo stordimento mediante pistola a proiettile captivo penetrante seguita da dissanguamento.

Perché il colpo della pistola sia efficace nel rendere l'animale insensibile è molto importante che la pistola sia posizionata nel punto più idoneo a colpire il cervello dell'animale e sia appoggiata perpendicolarmente alla teca ossea (figura 1C). Per individuare tale punto è necessario per i suini in accrescimento immaginare una linea congiungente il centro dei due occhi e dal centro di essa sollevarsi 1-2 cm (figura 1A). Nelle scrofe o negli animali di grosse dimensioni tale punto si trova 3-4 cm al di sopra del centro di questa linea e leggermente spostato di lato (figura 1B). L'animale deve essere sempre contenuto in modo da poter posizionare correttamente la pistola; la contenzione deve essere il più possibile rispettosa del benessere dell'animale. Dato che la contenzione è evento stressante, un ottimo metodo, onde evitarla, è quello di sottoporre l'animale da uccidere ad un trattamento tranquillante (azaperone 40 mg/20 kg p.v.) prima del colpo.

**Figura 1.** Posizionamento corretto per la pistola a proiettile captivo penetrante nel suino in accrescimento (A), nell'adulto (B) e sezione del cranio (C)

**Picture 1.** Correct position for the captive bolt for growing pigs (A), adult pigs (B) and a section of the head (C)



È importante riuscire a stordire correttamente l'animale al primo sparo, poiché i danni alla scatola cranica derivanti dal primo colpo possono rendere meno efficace il secondo tentativo a causa dell'espansione delle ossa fratturate.

Questo metodo è efficace per i suini in accrescimento, mentre la sua efficacia si riduce nei riproduttori. Rispetto agli altri animali da allevamento, infatti, il cervello del suino non solo è localizzato in profondità nella scatola cranica ma tra l'osso frontale e la cavità cranica sono presenti anche dei seni, che aumentano di dimensione con l'aumentare dell'età degli animali. Nei riproduttori e nei soggetti di peso elevato, al di sotto dell'osso frontale è inoltre presente una cresta ossea; per questo motivo il punto di appoggio della pistola negli animali adulti non si trova nel centro del cranio, ma leggermente di lato, in modo da evitare questa prominente ossea. Dato lo spessore delle ossa craniche e dei seni frontali, in alcuni casi il chiodo può rimanere infisso nella fronte e risultare pericoloso per l'operatore a causa dei movimenti di caduta dell'animale. Nei grossi verri può essere molto difficile o addirittura impossibile utilizzare questo metodo.

L'azione del chiodo in acciaio determina danni irreversibili alla teca ossea e al cervello, e contemporaneamente il colpo inferto al cranio dal chiodo determina un'accelerazione della testa con uno spostamento rapido del cervello e un suo impatto contro le pareti ossee del cranio. Questo movimento determina un rapido e notevole aumento della pressione intra-cranica seguito da un altrettanto rapido crollo della pressione con danni ai vasi, ai nervi, al cervello stesso e una conseguente interruzione della normale attività elettrica del cervello

L'insieme di questi effetti determina nell'animale uno stato di incoscienza e insensibilità.

Le manifestazioni cliniche di un corretto stordimento sono le seguenti:

- collasso immediato
- comparsa di una fase tonica della durata anche solo di 3-5 secondi, seguita da una fase clonica (*pedalage*) che può perdurare più a lungo
- assenza di respirazione ritmica (apnea)
- assenza di riflesso corneale e di nistagmo (a differenza dello stordimento di tipo elettrico, con lo stordimento mediante pistola a proiettile captivo non deve essere presente alcun movimento oculare e gli occhi devono essere aperti lo sguardo deve essere fisso)
- sguardo fisso
- mandibola rilassata
- coda rilassata e afflosciata
- assenza di risposta a stimolazioni dolorose
- nessun tentativo di sollevare la testa o di rialzarsi
- assenza di vocalizzazioni.

Quando vengono applicati metodi di stordimento reversibili (es. elettroincoscosi, biossido di carbonio, commozione cerebrale, ecc.), se non viene eseguito rapidamente il dissanguamento, dopo alcuni minuti si manifesta il risveglio con la comparsa graduale dei riflessi ed infine il ripristino posturale.

Il monitoraggio dei segni clinici, che si manifestano dopo lo sparo, sono utili per comprendere se l'animale è stato stordito in modo corretto o se è necessario intraprendere misure correttive. Ovviamente l'animale dopo lo sparo non dovrà mai manifestare riflesso corneale, respirazione ritmica, tentativi di sollevarsi o qualsiasi altro segno di coscienza, ma anche la mancata manifestazione di una fase tonica sta a significare che lo stordimento non è stato eseguito correttamente e che deve essere ripetuto il prima possibile.

Lo stordimento deve essere seguito il più rapidamente possibile (e comunque entro 15 secondi) da un dissanguamento pettorale profondo (*chest sticking*) che deve recidere tutti i grossi vasi all'eminanza cardiaca per promuovere un dissanguamento copioso e rapido.

Dopo 20-25 secondi da un dissanguamento pettorale profondo eseguito correttamente, la reattività cerebrale dell'animale cessa in modo irreversibile. Al termine del dissanguamento la morte dell'animale è clinicamente evidenziabile dall'assenza dei riflessi corneale e palpebrale, assenza della respirazione, del battito cardiaco e presenza di pupille dilatate.

Un'alternativa a questo metodo è rappresentata dallo stordimento mediante elettroincoscosi a livello della testa seguito dall'abbattimento mediante applicazione sternale (induzione di fibrillazione cardiaca). Questo metodo, se correttamente eseguito, è ritenuto altamente positivo dai recenti punti di vista sul benessere, in particolare per gli animali di grosse dimensioni, per i quali lo stordimento con proiettile captivo penetrante potrebbe non essere

sempre pienamente efficace. Tuttavia, attualmente non sono ancora diffuse apparecchiature mobili utilizzabili in campo.

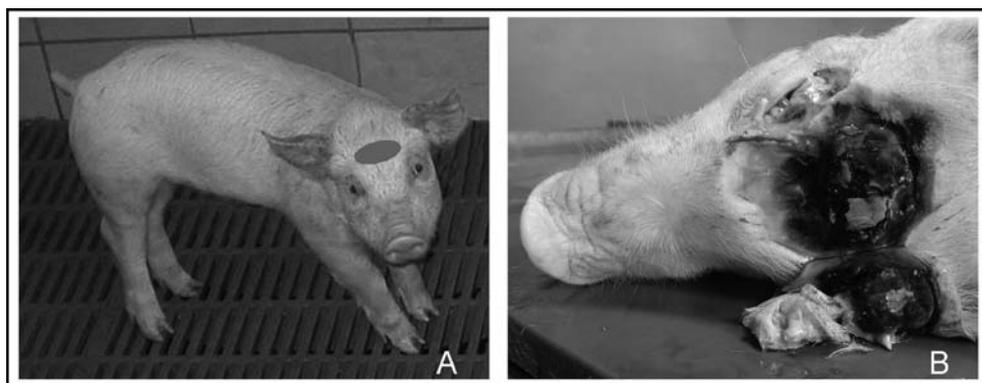
#### *Suini < 5kg*

Poiché in questa categoria non è consigliabile lo stordimento mediante pistola a proiettile captivo penetrante per le ridotte dimensioni dell'animale (rischio per l'operatore), il metodo che appare più idoneo viene ritenuto il trauma cranico da percussione.

Il metodo consiste nel colpire con forza e con un appropriato oggetto contundente la regione frontale (figura 2A). E' importante che il colpo sia forte abbastanza da determinare un danno alla scatola cranica e al cervello (2B) e che non induca un semplice stordimento, ma l'interruzione immediata di tutte le funzioni vitali. Se effettuato correttamente il metodo è indolore e la perdita di coscienza è immediata; l'animale manifesta dapprima una fase tonica che è seguita da pedalamento. I movimenti scompaiono dopo circa un minuto e mezzo e, se non jugulato, l'animale va incontro ad arresto cardiaco in meno di 10 minuti. Il colpo determina, a seguito della distruzione della massa cerebrale, emorragia locale (naso, bocca, orecchie) più o meno estesa. Sebbene il metodo sia esteticamente non gradevole, è rapido ed efficace per questa categoria di animali (Chevillon et al., 2004). Allo stordimento deve comunque seguire la recisione dei grossi vasi.

**Figura 2.** *Posizionamento corretto per il trauma cranico e cerebrale da percussione ed effetti sulla scatola cranica*

**Picture 2.** *Correct position for the blunt trauma at the head and its effects on the skull*



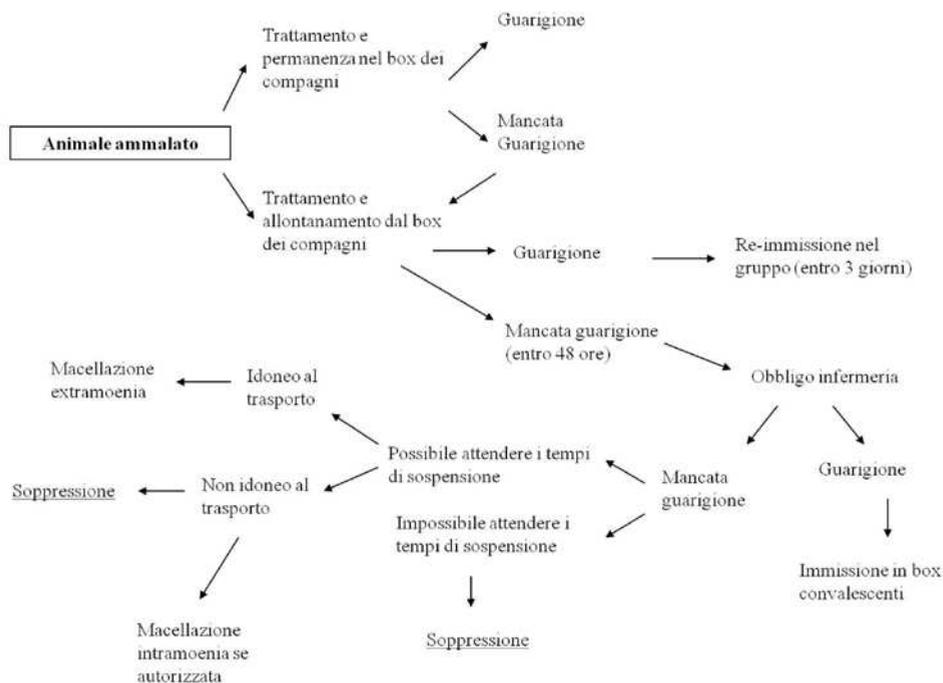
## **DISCUSSIONE**

Lo stordimento dei suini mediante pistola a proiettile captivo penetrante per i suini >5kg e il colpo da percussione nei suini <5kg, seguiti da dissanguamento profondo rappresentano due metodi eutanasi che rispondono, per le attuali conoscenze, sia ai requisiti di rispetto del benessere animale che di praticità ed economicità aziendale.

La scelta del metodo di soppressione e il training del personale rappresenta tuttavia solo un aspetto dell'eutanasia dei suini in allevamento. Il punto cruciale per un allevatore è, infatti, la decisione quotidiana sull'opportunità o meno di effettuare l'eutanasia su un animale. L'approccio al problema è duplice poiché si devono considerare da un lato il benessere dell'animale e dall'altro quale sia la scelta economicamente più vantaggiosa per l'allevatore, due aspetti spesso in antitesi.

In figura 3 viene riportato un esempio di algoritmo decisionale utilizzabile in allevamento per determinare in quale momento è opportuno sottoporre l'animale ammalato ad eutanasia.

**Figura 3. Algoritmo decisionale.**  
**Figure 3. Decision algorithm.**



## CONCLUSIONI

La scelta di sottoporre a soppressione un animale e la valutazione del metodo più idoneo per effettuarla non possono rappresentare delle decisioni estemporanee, ma dovrebbero far parte di un piano di buona conduzione aziendale al pari di altre strategie aziendali quali i piani vaccinali o di biosicurezza. È importante che il medico veterinario sia coinvolto nella elaborazione, gestione e applicazione del piano di azione per la soppressione al fine di poter supportare l'allevatore nelle scelte più opportune per l'economia aziendale, nel rispetto della normativa e del benessere animale.

Si ringrazia il sig. Giuseppe Bertocchi, Laboratorio Microscopia Elettronica - Reparto Virologia Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (I.Z.S.L.E.R.).

## BIBLIOGRAFIA

Candotti P, Metodi e procedure operative per l'eutanasia degli animali appartenenti alla specie equina, bovina, ovi-caprina e suina.  
[http://www.trasportoanimali.it/n/allegati/altro/Metodi\\_per\\_Eutanasia-Centro\\_di\\_Riferenza\\_Nazionale.pdf](http://www.trasportoanimali.it/n/allegati/altro/Metodi_per_Eutanasia-Centro_di_Riferenza_Nazionale.pdf). Accessed January 18, 2011 .

Chevillon P, Mircovich C, Dubroca S, Fleho Jy Comparison of different pig euthanasia methods available to the farmers. Proceedings of the International Society for Animal Hygiene, 2004, 45-46.

D.Lgs. 1 settembre 1998, n. 333. Attuazione della direttiva 93/119/CE relativa alla protezione degli animali durante la macellazione o l'abbattimento.

Decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 534. Attuazione della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini [modificato dal DLgs. 20 febbraio 2004, n. 53].

Decreto legislativo 26 marzo 2001, n. 146. Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti [modificato dalla Legge 27/12/2004, n. 306].

European Food Safety Authority- AHAW/04-027 “Welfare aspects of animal stunning and killing methods” Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of animal stunning and killing methods (Question N° EFSA-Q-2003-093), *The EFSA Journal* (2004), 45, 1-29, Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals.

Morrow WEM, Meyer RE, Roberts J, et al. Financial and welfare implications of immediately euthanizing compromised nursery pigs. *J Swine Health Prod.* 2006;14:25–34.

On-farm euthanasia of swine - Options for the producer. Available at [www.porkboard.org](http://www.porkboard.org). Accessed January 18, 2011

Regolamento (CE) n. 1099/2009 del 24 settembre 2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento.

Turner PV and Doonan G (2010) Developing on-farm euthanasia plans *Can Vet J.* 51(9): 1031–1034.

# EFFETTO DEL SESSO E DELL'ETÀ SULL'UTILIZZO DI DIVERSI TIPI DI ARRICCHIMENTI AMBIENTALI IN SUINI PESANTI ITALIANI ALL'INGRASSO

## AGE AND GENDER EFFECT ON THE USE OF DIFFERENT TYPES OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENTS IN ITALIAN FATTENING HEAVY PIGS

SCOLLO A.<sup>1</sup>, DI MARTINO G.<sup>2</sup>, PREVEDELLO P.<sup>1</sup>, RAMPIN F.<sup>2</sup>,  
BONFANTI L.<sup>2</sup>, GOTTARDO F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova;

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

**Parole chiave:** benessere, arricchimenti ambientali, età, sesso, suino pesante.

**Key words:** welfare, environmental enrichments, age, gender, heavy pig.

**Riassunto.** Lo studio è stato effettuato su 336 suini durante la loro intera fase di ingrasso, con stabulazione a sessi separati. Sono state effettuate 4 osservazioni comportamentali dirette a 3, 9, 18 e 29 settimane del ciclo di ingrasso con la *Scan Sampling Technique*. Si sono registrate per ciascun box le attività esplorative dei suini nei confronti di diversi materiali ed arricchimenti ambientali, quali catene metalliche, catene gommate, segatura, abbeveratoi, paglia contenuta in una rastrelliera e paglia caduta a terra dalla rastrelliera. È stata inoltre registrata l'inattività degli animali. L'aumento dell'età è risultato essere un fattore fortemente correlato alla diminuzione dell'interesse del suino verso tutti gli arricchimenti ambientali, tranne la paglia contenuta all'interno della rastrelliera. Inoltre si è rilevata la sensibile preferenza dei suini per la paglia (16,3%) piuttosto che per qualsiasi altro materiale (9,7%), soprattutto nelle prime settimane di ingrasso. Nessuna differenza significativa è stata invece riscontrata tra i sessi.

**Abstract.** *The study was carried out in 336 pigs during their entire fattening cycle, with separate gender relaying. Direct behavioural observations were collected at 3, 9, 18 and 29 weeks of the fattening with Scan Sampling Technique. Pigs behaviour was registered for each box against various materials and environmental enrichments, such as metal chains, rubber chains, sawdust, nipple drinker, straw in a rack and straw fallen on the floor from the rack. It was also recorded inactivity of the animals. Increasing age was a factor strongly correlated to the decrease of the pig interest for all the environmental enrichments, but not for the straw in the rack. In addition, it is showed the preference of pigs for the straw (16.3%) than for other materials (9.7%), especially in the first week of fattening. No significant difference was found between gender.*

### INTRODUZIONE

I moderni sistemi di allevamento suinicolo intensivo spesso non mettono a disposizione dell'animale alcun tipo di strumento che permetta l'espressione del pattern comportale proprio della specie. Questo porta inevitabilmente il suino, che per natura ha un atteggiamento altamente esplorativo, a sviluppare uno stato di stress con manifestazioni comportamentali alterate quali le stereotipie o ad indirizzare il proprio interesse verso i conspecifici presenti nel medesimo gruppo con sviluppo di forme di aggressività (Van de Weerde and Day, 2009). Le più frequenti e dannose conseguenze

della frustrazione originata da un ambiente privo di stimoli sono l'incremento dell'incidenza di belly nosing e morsicature alle estremità quali coda ed orecchie (Schroder-Petersen and Simonsen, 2001; Beattie et al., 2001; Van de Weerd et al., 2005).

La Direttiva Comunitaria 2001/93/EC impone la presenza degli arricchimenti ambientali negli allevamenti suinicoli quali mezzo per consentire l'espressione del comportamento esplorativo dell'animale, riconoscendone gli effetti positivi sullo stato di benessere complessivo. Le caratteristiche che rendono elettivo allo scopo un substrato sono state esaminate da diversi autori. Van de Weerd et al. (2003) e Zonderland et al. (2003) hanno comparato differenti tipi di materiale, individuando come preferiti dai suini quelli ingeribili, masticabili, distrutibili, flessibili, odorosi e grufolabili. La paglia rappresenta uno tra i migliori substrati che riassumono tali caratteristiche (Scott et al., 2006; Bracke et al., 2006b), tuttavia diversi test di preferenza effettuati in suini di differenti età individuavano anche altri materiali idonei quali torba, compost di funghi, sabbia, segatura, trucioli e ramaglie (Studnitz et al., 2006; Jensen and Pedersen, 2010). Il rischio legato all'utilizzo di tali arricchimenti, soprattutto in allevamenti con pavimentazione a grigliato, è però la possibile ostruzione dei sistemi di allontanamento dei reflui. Diversi autori hanno perciò studiato oggetti e materiali alternativi che ovviassero al problema, come le catene, oggetti in gomma, pneumatici d'auto e quant'altro potesse rappresentare uno stimolo per il suino (Stubbe, 2000; Scott et al., 2006; Van de Weerd et al., 2006). Tra gli arricchimenti alternativi proposti, le catene sono l'arricchimento ambientale più comune negli allevamenti suinicoli ma, sebbene attraggano gli animali e li tengano impegnati, alcuni studi sostengono non siano efficienti come la paglia a diminuire l'insorgenza di fenomeni di aggressività ed in particolare di morsicature alla coda (Stubbe et al., 1999).

Qualsiasi arricchimento ambientale stimola l'attività esplorativa soprattutto quando esso rappresenta una novità, mentre un oggetto conosciuto desta sensibilmente meno la curiosità degli animali (Day et al., 2002), tuttavia non è noto se alcuni substrati abbiano maggiori capacità rispetto agli altri di mantenere inalterata nel lungo periodo di tempo tale attrattiva. Scopo del presente lavoro è comparare alcuni tra i più comuni arricchimenti ambientali per verificarne l'efficacia durante l'intero ciclo di ingrasso del suino pesante italiano. Questa specifica tipologia di allevamento infatti potrebbe rappresentare una situazione di maggiore rischio per il benessere animale per la protratta fase di produzione rispetto al contesto europeo. Inoltre si è voluto indagare sulle eventuali differenze tra sessi, verificando se l'avvicinarsi o il raggiungimento della maturità sessuale delle femmine possa far differire il loro comportamento esplorativo da quello del maschio castrato.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato effettuato su 336 suini ibridi commerciali durante la loro intera fase di ingrasso, della durata di 30 settimane con inizio in ottobre 2009 e termine a maggio 2010. I suini, equamente rappresentati da maschi castrati e femmine, erano stabulati a sessi separati in 12 box da 28 soggetti ciascuno, nel rispetto della normativa vigente sulla densità di allevamento (D. Lgs. 20 febbraio 2004, n. 53, art. 1, comma 1). I box presentavano pavimentazione piena ed un'area di defecazione esterna con grigliato. I suini ricevevano due pasti al giorno e l'alimentazione era liquida. Gli animali venivano controllati due volte al giorno dal responsabile dell'allevamento per identificare e separare dal gruppo gli eventuali soggetti affetti da patologie o gravemente feriti. Durante l'intero ciclo di ingrasso, sono stati misurati bimensilmente l'intensità luminosa ed il livello di rumorosità con un analizzatore ambientale multi-funzione (Lafayette mod. DT-8820) per accertarsi del rispetto dei parametri indicati dalla normativa vigente (D. Lgs. 20 febbraio 2004, n. 53, allegato). In concomitanza a tale monitoraggio, sono state inoltre registrate le concentrazioni di CO<sub>2</sub> ed ammoniaca ambientali con lo strumento DRAGER X-am7000.

In ciascun box erano presenti come arricchimenti ambientali una catena metallica ed una catena ricoperta da un tubo di gomma, entrambe pendenti da un gancio apposto sulla parete. La paglia lunga era invece messa in una rastrelliera agganciata al muro di ciascun box e presentava fori a maglie 10x10 cm. La quantità di paglia a disposizione di ciascun gruppo di suini era abbondante e rabboccata al limite di capacità della griglia quando quest'ultima si fosse anche solo parzialmente svuotata. In ogni box inoltre a giorni alterni veniva distribuita sul pavimento della segatura (2 kg/box).

### Osservazioni comportamentali

Le osservazioni sono state effettuate nelle settimane 3, 9, 18 e 29 del ciclo di ingrasso. Il comportamento dei suini è stato monitorato per osservazione diretta da parte di 3 osservatori, ciascuno dei quali ha registrato in ogni giornata di prova i dati relativi ad un box di femmine e ad un box di maschi castrati. Per effettuare l'osservazione di tutti i box, le giornate deputate al monitoraggio erano due consecutive per ciascuna sessione. Durante ciascuna giornata, i suini sono stati monitorati per 2 ore ininterrotte durante la mattina dalle ore 10 alle ore 12, e per altre 2 ore nel pomeriggio dalle 14 alle 16.

Per l'osservazione dei comportamenti è stata utilizzata la tecnica dello *Scan Sampling* (Martin and Bateson, 2007) con intervalli di campionamento di 2 minuti. Ad ogni scansione veniva registrato il numero di animali impegnati nei comportamenti indicati in Tabella 1.

**Tabella 1.** *Descrizione dei comportamenti osservati.*

**Table 1.** *Description of the observed behaviours.*

Comportamento	Definizione del comportamento
Distesi	Soggetti distesi sul lato o sullo sterno, in atteggiamento di riposo.
Attività dirette verso la rastrelliera con la paglia	Soggetti che annusano, masticano o leccano la griglia o tirano fuori la paglia del cesto.
Attività dirette verso la paglia caduta a terra	Soggetti che grufolano, annusano, mangiano la paglia caduta per terra dalla griglia.
Attività dirette verso la segatura	Soggetti che grufolano, annusano, mangiano la segatura sparsa sul pavimento.
Attività dirette verso l'abbeveratoio	Soggetti che bevono o giocano con l'abbeveratoio.
Attività dirette verso le catene metalliche	Soggetti che annusano, masticano, succhiano o giocano con le catene metalliche.
Attività dirette verso le catene gommate	Soggetti che annusano, masticano, succhiano o giocano con le catene ricoperte con la plastica.

### Analisi statistica

In fase di elaborazione dei dati, ciascuno dei comportamenti osservati è stato espresso come percentuale sul totale dei suini presenti al momento dell'osservazione e che pertanto potevano

effettuare quella specifica attività. Tali percentuali sono state calcolate per ogni box e per ogni sessione di osservazione. I dati così ottenuti sono stati quindi sottoposti alla PROC UNIVARIATE (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary NC) per individuare valutarne la distribuzione. Sono state considerate normali le variabili con valori del test di Shapiro-Wilk ( $W \geq 0.95$ ), mentre se inferiori venivano sottoposte a trasformazione logaritmica per correggerne la mancanza di normalità. Le variabili sono dunque state processate statisticamente applicando la PROC MIXED (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary NC) ed utilizzando un modello lineare per valutare gli effetti fissi di sesso, settimana del ciclo di ingrasso e loro interazioni. Il box rappresentava l'effetto casuale.

## RISULTATI

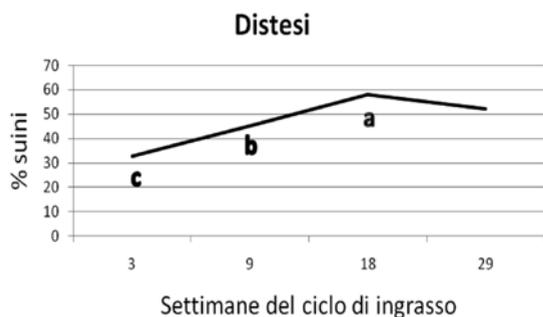
Il fattore sesso non ha modificato nessuno dei comportamenti osservati (Tabella 2). Non si sono inoltre rilevate differenze tra femmine e maschi castrati in relazione all'età.

**Tabella 2.** Effetto del sesso sulla percentuale di suini distesi o interessati ai diversi tipi di arricchimenti presenti nel box.

**Table 2.** Effect of gender on the percentage of pigs lying or interested to the different enrichments available in the pen.

Tipo di comportamento	Sesso		RMSE	P
	Femmine	Maschi castrati		
Distesi	47,6	46,7	6,92	0,67
Attività dirette verso la rastrelliera con la paglia	6,8	6,7	1,72	0,79
Attività dirette verso la paglia caduta a terra	9,2	9,9	2,61	0,35
Attività dirette verso la segatura	1,4	1,3	0,79	0,65
Attività dirette verso l'abbeveratoio	0,4	0,3	0,21	0,58
Attività dirette verso le catene metalliche	0,8	1,0	0,53	0,30
Attività dirette verso le catene gommate	0,8	0,8	0,49	0,77

Al contrario l'età di per sé è risultata essere un fattore che influenza fortemente il comportamento dei suini con particolare riferimento all'utilizzo degli arricchimenti ambientali. Via via che procede la fase di ingrasso si osserva un aumento del decubito (Figura 1) e una riduzione complessiva di interesse nei confronti degli arricchimenti (Figura 2).



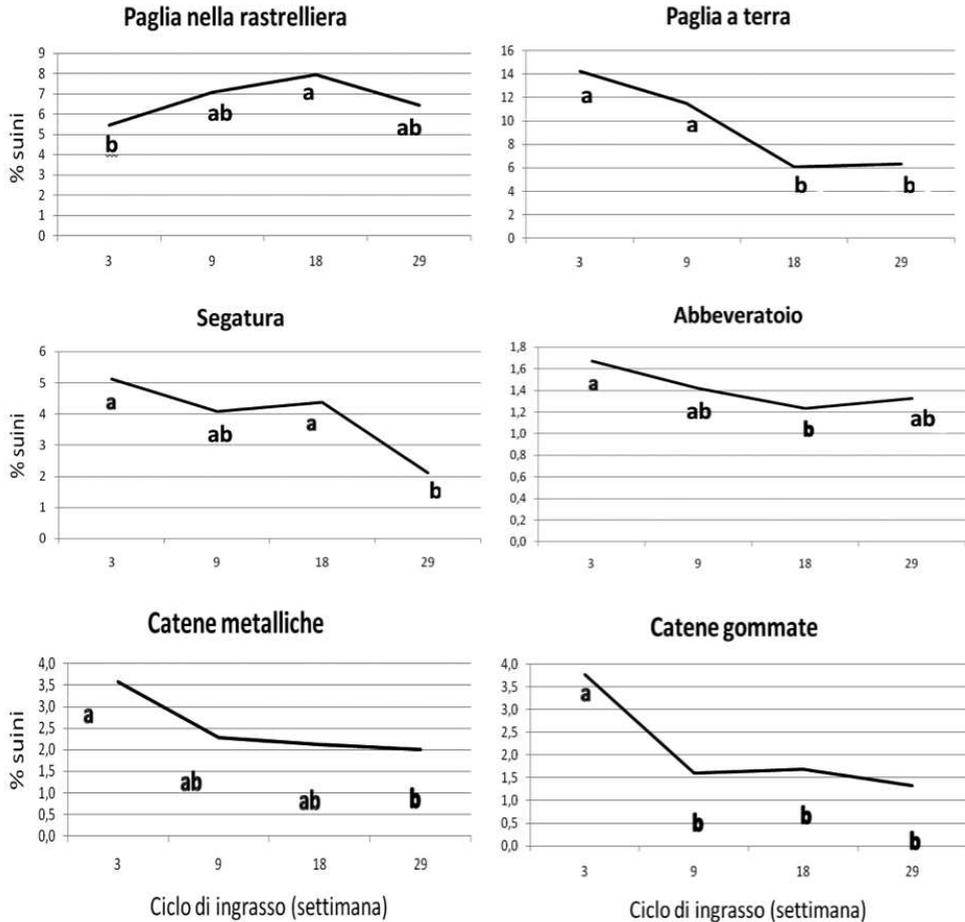
**Figura 1.** Effetto dell'età sulla percentuale di suini in atteggiamento di riposo.

**Figura1.** Effects of the age on the percentage of pigs lying.

La percentuale di animali che effettuano attività esplorativa verso la paglia caduta a terra dalla rastrelliera, la segatura, l'abbeveratoio e le diverse tipologie di catene diminuisce sensibilmente con l'aumentare dell'età dei suini. L'unica attività per la quale non si osservata una caduta di interesse e quella rivolta alla paglia contenuta all'interno della rastrelliera.

**Figura 2.** Effetto dell'età sulla percentuale di suini interessati ai differenti arricchimenti ambientali presenti nel box.

**Figure 2.** Effect of the age on the percentage of pigs interested to the environmental enrichments available in the pen.



a,b:  $P < 0,0001$ .

a,b:  $P < 0,0001$ .

Confrontando i valori medi dell'intero periodo di ingrasso per ciascun arricchimento ambientale, si rileva la sensibile preferenza dei suini per la paglia (16,3%) piuttosto che per qualsiasi altro materiale (9,7%) (Tabella 3). Nessuno dei materiali adottati ha creato problematiche legate alla gestione dei reflui nell'intero periodo del ciclo di ingrasso.

**Tabella 3.** *Percentuale media di suini interessati a ciascun arricchimento ambientale.*  
**Table 3.** *Percentage means of swine interested to each environmental enrichment.*

Tipo di comportamento	% media di suini
Attività dirette verso la rastrelliera con la paglia	6,7
Attività dirette verso la paglia caduta a terra	9,6
<b>Totale di contatto con la paglia</b>	<b>16,3</b>
Attività dirette verso la segatura	3,7
Attività dirette verso l'abbeveratoio	1,4
Attività dirette verso le catene metalliche	2,4
Attività dirette verso le catene gommate	2,2
<b>Totale di interesse per gli arricchimenti diversi dalla paglia</b>	<b>9,7</b>

## DISCUSSIONE

Nonostante il diverso assetto ormonale raggiunto soprattutto a fine ciclo di ingrasso tra maschi castrati e femmine che sicuramente avevano raggiunto la pubertà non si sono riscontrate differenze nei comportamenti rilevati. Questo risultato è in accordo riportato da Docking et al. (2008) su suini più giovani. L'andamento generale dell'interesse dimostrato dai suini per gli arricchimenti ambientali nel tempo è risultato essere il medesimo di quanto riportato da altri autori che si erano principalmente occupati di suini leggeri. Un materiale messo a disposizione dei suini all'interno del box stimola l'attività esplorativa degli animali soprattutto quando rappresenta una novità (Day et al., 2002). Anche Docking et al. (2008), avevano rilevato un calo di interesse verso gli arricchimenti presenti a seguito della progressiva abitudine alla loro presenza mentre Petersen et al. (1995) e Jensen et al. (2010) avevano evidenziato una percentuale crescente di suini in riposo, confermando la minore attività dell'animale adulto piuttosto che del giovane.

Le attività rivolte verso la rastrelliera contenente la paglia ed in particolare il lavoro svolto per estrarre questo materiale dal contenitore non hanno fatto registrare una caduta di interesse come è avvenuto invece per gli altri arricchimenti. La paglia nella rastrelliera sembra quindi essere l'unico attività substrato in grado di mantenere elevato l'interesse esplorativo degli animali nel tempo. La continua somministrazione di nuova paglia e le sue caratteristiche di distruttibilità ed ingeribilità sembrano essere alla base del permanente interesse dei suini (Docking et al. 2008). Inoltre, gli animali si sono dimostrati più attratti dall'abbondante paglia nella rastrelliera piuttosto che dalla scarsa paglia che ne fuoriusciva sul pavimento in quanto una maggiore quantità di materiale incrementa l'espressione del comportamento esplorativo (Day et al., 2002). Sebbene l'attività esplorativa dei suini nei confronti della paglia nella rastrelliera sia l'unica ad essere cresciuta nel tempo, nelle fasi iniziali del ciclo di ingrasso i suinetti sono risultati molto più interessati alla paglia caduta a terra. Questa preferenza potrebbe essere stata indotta dalla maggior difficoltà a estrarre la paglia da tutta la superficie della rastrelliera per effetto della ridotta altezza dei suinetti.

Oltre a rappresentare l'arricchimento ambientale in grado di stimolare con più costanza il comportamento esplorativo del suino nel tempo, la paglia si è dimostrata il materiale maggiormente scelto dagli animali a qualsiasi età. Sebbene le sue caratteristiche siano paragonabili a quelle della segatura (Studnitz et al., 2006), si riporta una evidente differenza

nella manipolazione dei due materiali da parte degli animali. La percentuale di suini interessati alla segatura si è infatti dimostrata molto inferiore rispetto alla percentuale che riguardava la paglia, probabilmente per la rapidità con la quale la segatura si rendeva inutilizzabile, soprattutto per effetto della sua dispersione sull'intera superficie calpestabile.

## **CONCLUSIONI**

Tra gli arricchimenti messi a disposizione nel box, la paglia si è dimostrata essere quella capace di creare il maggiore interesse tra i suini. Inoltre la sua raccolta dentro alla rastrelliera ha richiesto all'animale una sorta di impegno per l'estrazione, contribuendo in questo modo a mantenere elevata la motivazione alla sua esplorazione. Non è trascurabile poi il vantaggio gestionale della soluzione "rastrelliera" in quanto ha limitato la dispersione della paglia sulla pavimentazione del box riducendo il rischio mal funzionamento dei sistemi di allontanamento dei reflui. Tuttavia è consigliabile utilizzare una griglia di contenimento con maglie non troppo strette per consentire ad una modesta quantità di materiale di fuoriuscire e cadere sul pavimento, e garantire così una buona attività esplorativa anche nei soggetti più giovani. Maschi castrati e femmine non sembrano richiedere differenze nella gestione degli arricchimenti ambientali in quanto hanno una risposta comportamentale è simile.

## **BIBLIOGRAFIA**

BEATTIE V.E., SNEDDON I.A., WALKER N., WEATHERUP R.N., 2001. Environmental enrichment of pig housing using spent mushroom compost. *Animal Science* 72, 35-42.

BRACKE M.B.M., ZONDERLAND J.J., BLEUMER E.J.B., 2006b. Expert judgement on enrichment materials for pigs validates preliminary RICHPIG model. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 1-13.

DAY J.E.L., BURFOOT A., DOCKING C.M., WHITAKKER X., SPOOLDER H.A.M., EDWARDS S.A., 2002. The effects of prior experience of straw and the level of straw provision on the behaviour of growing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 76, 189-202.

DOCKING C.M., VAN DE WEERD H.A., DAY J.E.L., EDWARDS S.A., 2008. The influence of age on the use of potential enrichment objects and synchronisation of behaviour of pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 110, 244-257.

JENSEN M.B., PEDERSEN L.J., 2010. The effect of feeding level and access to wood chip on explorative and aggressive behaviour in growing pig in situations with reduced feeding space and delayed feeding. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 123, 1-6.

MARTIN P., BATESON P., 2007. *Measuring Behaviour, an introductory guide.* Cambridge University Press, Third Edition, UK.

PETERSEN V., SIMONSEN H.B., LAWSON L.G., 1995. The effect of environmental stimulation on the development of behaviour in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 45, 215-224.

SCHRODER-PETERSEN D.L., SIMONSEN H.B., 2001. Tail biting in pigs. *Vet. J.* 162, 196-210.

SCOTT K., CHENNELS D.J., CAMPBELL F.M., HUNT B., ARMSTRONG D., TAYLOR L., GILL B.P. EDWARDS S.A., 2006. The welfare of finishing pigs in two contrasting housing systems: Fully-slatted versus straw-bedded accommodation. *Livest. Sci.* 103, 104-115.

STUBBE A., 2000. Entwicklung und Beurteilung einer Beschäftigungstechnik für Mast Schweine in intensiven Haltungssystemen. Institut für Agrartechnik. Universität Hohenheim, Hohenheim.

STUBBE A., BECK J., JUNGBLUTH T., 1999. Improvement of animal welfare in intensive pig management systems by an activity displacement technique. *Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft*, 193, 167-171.

STUDNITZ M., JENSEN M.B., PEDERSEN L.J., 2006. Why do pigs root and in what will they root? *Applied Animal Behaviour Sci.* (doi:10.1016/j.applanim.2006.11.0013).

VAN DE WEERD H.A., DAY J.E.L., 2009. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behaviour Science* 116 (2009) 1-20.

VAN DE WEERD H.A., DOCKING C.M., DAY J.E.L., AVERY P.J., EDWARDS S.A., 2003. A systematic approach towards developing environmental enrichments for pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 84, 101-118.

VAN DE WEERD H.A., DOCKING C.M., DAY J.E.L., BREUER K., EDWARDS S.A., 2006. Effects of species relevant environmental enrichment on the behaviour and productivity of finishing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 99, 230-247.

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. *Animal Science* 80, 289-298.

ZONDERLAND J.J., VERMEER H.M., VEREIJKEN P.F.G., SPOOLDER H.A.M., 2003. Measuring a pig's preference for suspended toys by using an automated recording technique. *CIGR Ej.* V 1-11.

# ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DEI RITORNI SU UN CAMPIONE DI 18.000 SCROFE NEL NORD ITALIA

## *RETURNS DISTRIBUTION ANALYSIS OF 18,000 SOWS SAMPLE IN NORTHERN ITALY*

MAZZONI C.<sup>1</sup>, TONON F.<sup>1</sup>, BORRIE.<sup>1</sup>, RAFFI V.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>2</sup>,  
BONILAURI P.<sup>3</sup>, DONNA R.<sup>1</sup>, GHERPELLI M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Veterinario libero professionista Suivet  
mazzoni@suivet.it*

<sup>2</sup>*Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina  
Veterinaria, Dip. Scienze Animali.*

<sup>3</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e  
dell'Emilia Romagna;*

**Parole chiave:** Ritorni, Sindrome dell'Infertilità Stagionale, Raffrescatori

**Key words:** Returns, Seasonal Infertility Syndrome, Cooling system

**Riassunto.** Nel presente lavoro sono stati analizzati i dati legati alla fertilità fino ai 44 giorni di gestazione dell'anno 2009, provenienti da venti allevamenti del nord Italia, per un totale di oltre 18.000 scrofe. In particolare sono state osservate le diverse classi di ritorno in estro: RC1 (18-23gg), RA1 (24-30gg), RA2 (31-38gg) ed RC2 (39-44gg). Questi dati sono stati poi valutati nel periodo legato alla sindrome dell'infertilità stagionale. I risultati hanno messo in evidenza che gli RC1 sono maggiormente presenti nel periodo di luglio ed agosto, mentre gli RA1 includono anche settembre ed ottobre, rispetto al resto dell'anno. Di un certo interesse l'osservazione fatta sulle aziende con sistema di raffrescamento che hanno evidenziato nel trimestre luglio, agosto e settembre una minore incidenza sia di RC1 che di RA1 nei confronti delle altre aziende sprovviste di tali sistemi.

**Abstract.** In this paper we report data about fertility up to 44 days of gestation from twenty farms located in northern Italy. A total of about 18,000 sow were observed during 2009. In particular, the different classes of estrus return: RC1 (18-23gg), RA1 (24-30days) RA2 (31-38gg) and RC2 (39-44gg), were recorded. These data were analysed to detect Seasonal Infertility Syndrome, if preset. The results showed that the RC1 is, significantly, more prevalent during July and August, while the RA1 is more frequent including September and October too, compared to the rest of the year. Moreover it is worthy of note that farms where cooling system is present and active during the July, August and September have shown significantly lower incidence of RC1 and RA1 against farms where cooling systems are not preset.

### INTRODUZIONE

Nel corso della nostra attività professionale di campo l'ecografia, oltre ad essere un importante strumento diagnostico, suscita da sempre in noi un certo interesse scientifico, per le numerose applicazioni che può avere. Uno dei quadri ecografici meno conosciuti ma più interessanti è quello del riassorbimento embrionale (Gherpelli M. 1999), identificabile con buona attendibilità da un operatore esperto e la cui segnalazione all'allevatore permette di non perdere di vista il successivo ritorno in estro fuori ciclo della scrofa.

Il convincimento maturato nel corso degli anni è quello di un aumento dei quadri ecografici

da riassorbimento durante i mesi estivi ed autunnali, particolarmente da luglio ad ottobre, a cui corrisponde un aumento dei ritorni fuori ciclo. In realtà nulla di nuovo poiché, ad un'indagine approfondita, questi riassorbimenti, uniti ai ritorni fuori ciclo, sono la prova che ci troviamo nel contesto della *sindrome dell'infertilità stagionale* (SIS), un tempo nota come "ipofertilità estiva".

La SIS può essere suddivisa in Complesso dell'Infertilità Estiva (CIE) e Sindrome degli Aborti Autunnali (SAA) in base ai sintomi e al periodo di comparsa (Levis D.G., 2001).

Clinicamente, la SIS presenta una vasta gamma di sintomi legati alla sfera riproduttiva: ritardata insorgenza della pubertà (Peltoniemi O.A.T., et al. 1999), aumento dell'anestro nelle scrofette (Thacker B.J., 2002), intervallo svezzamento-estro (ISE) prolungato nelle scrofe, aumento dell'ISCU (Ashworth C., 2006), con conseguente riduzione della messa in parto e delle dimensioni della covata (Almond G.W., et al. 1992); riduzione della fertilità per l'incremento dei ritorni in ciclo (18-23 giorni) e fuori ciclo (24-38 giorni dall'inseminazione – Reilly J.D., et al. 1991), aumento delle pseudogavidanze, delle scrofe vuote all'ecografia e delle vuote al parto (Peltoniemi et al., 1999) ed incremento degli aborti nei mesi autunnali (Sanford S.E., 1982, Almond G.W., et al., 1985).

In questa sindrome rientrano circa il 70% degli aborti rilevati in allevamento (Muirhead M.R., et al., 1997). Questi avvengono tra i 30 ed i 110 giorni di gestazione, con una concentrazione maggiore tra i 35 e 49 giorni dalla fecondazione (Martineau. GP, 2003). Le aziende affette da questa sindrome denunciano una diminuzione della messa in parto compresa fra il 5 ed il 20% (Mechler D.W. 2002).

## MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati valutati i dati produttivi relativi all'anno 2009, di 18.653 scrofe, con oltre 51.000 fecondazioni, suddivise in 20 allevamenti del nord Italia. Più precisamente le regioni interessate sono: Lombardia, Emilia Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia. Sono inoltre rappresentate differenti tipologie aziendali: a ciclo aperto, chiuso e semiaperto; le consistenze numeriche variano dalle 350 alle 2600 scrofe per allevamento, con svezzamento ogni settimana (20 o 21 bande), ogni 2 settimane (10 bande) e ogni 3 settimane (7 bande). Diversi anche i profili genetici e le strategie di rimonta così come l'approvvigionamento del seme che è acquistato da alcune ed autoprodotta da altre. In base ai sistemi di condizionamento dell'aria, in gestazione od in sala parto, le aziende sono state suddivise in due gruppi:

- Gruppo 1 con sistema di raffrescamento inadeguato (12 aziende su 20 pari a 12.669 scrofe): assente o scarsa ventilazione in sala parto e ventilatori primo terzo della gestazione.
- Gruppo 2 con sistema di raffrescamento adeguato (8 aziende su 20 pari a 5.984 scrofe): *cooling system* o ventilatori in sala parto e nel primo terzo della gestazione contemporaneamente.

Il quadro sanitario delle aziende è di tipo convenzionale e, più nello specifico, PRRSv positivo.

Nel contesto dei dati produttivi di ciascuna azienda, l'analisi è stata rivolta verso la fertilità con particolare riferimento alla distribuzione delle classi di ritorno. L'acquisizione dei dati è stata resa possibile grazie all'ausilio di una scheda specifica (diagnostico dei ritorni), già proposta in passato (Mazzoni C. et al. 2010), oppure tramite software aziendale, dopo aver impostato l'opportuna richiesta.

Le classi di ritorno proposte sono qui di seguito elencate (Mazzoni C. et al. 2010):

-RC1 (ritorni in ciclo di 1° tipo): fra i 18-23 giorni dall'inseminazione corrispondenti ai ritorni in estro regolari ciclici.

-RA totali (ritorni fuori ciclo totali): fra i 24 ed i 38 giorni dall'inseminazione (corrispondenti ai ritorni in estro irregolari o aciclici) a loro volta suddivisi in:

-RA1 (ritorni fuori ciclo di 1° tipo): dai 24 ai 30 giorni dall'inseminazione (riassorbimenti embrionali)  
 -RA2 (ritorni fuori ciclo di 2° tipo): dai 31 ai 38 giorni dall'inseminazione (perdite di gravidanza per aborti precoci)  
 -RC2 (ritorni in ciclo di 2° tipo): dai 39 ai 44 giorni dall'inseminazione (corrispondenti ai secondi ritorni in ciclo, evenienza legata soprattutto ad una mancata rilevazione degli RC1, oltre che più di rado ad aborti).  
 Il supporto scientifico di tale classificazione è basato sulla presenza/assenza dei segnali di gravidanza che gli embrioni inviano alla scrofa nelle prime settimane di gestazione come riportato in tabella 1.

**Tabella 1:** Schema riepilogativo dei segnali di gravidanza nella scrofa (Martineau 2003 modificato).

**Table 1:** Schematic summary of pregnancy signals in sows (Martineau 2003 modified)

Giorni dall'inseminazione	Epoca del segnale embrionale		
	I 11° al 13°	II 17° al 25°	
Segnale di gravidanza	-		Ritorno in ciclo (a 18-23 giorni)
Segnale di gravidanza	+	-	Ritorno fuori ciclo (a 24-38 giorni)
Segnale di gravidanza	+	+	Parto, Aborto o Pseudogravidanza

#### Analisi statistica

All'interno dei ritorni aciclici (RA) la frequenza di quelli di primo tipo (RA1) rispetto a quelli di secondo tipo (RA2) è stata confrontata utilizzando il test P (livello di significatività posto a  $p < 0.01$ ), assumendo come ipotesi nulla una uguale distribuzione delle due tipologie di ritorni aciclici tra il totale dei RA osservati.

Per ogni singola azienda, la percentuale di scrofe vuote rispetto alle inseminazioni avvenute è stato calcolato per i 12 mesi dell'anno 2009, secondo la formula:

$$\%V_{totIA}_{mese} = n_{scrofe\ vuote}_{mese} / n_{inseminazioni\ avvenute}_{mese} * 100$$

Inoltre per ogni azienda e per ogni mese dell'anno 2009, sono state calcolate le percentuali di ritorni ciclici di primo tipo RC1 relativamente alle inseminazioni avvenute, secondo la formula:

$$\%RC1IA_{mese} = n_{RC1}_{mese} / n_{inseminazioni\ avvenute}_{mese} * 100$$

Infine per ogni azienda e per ogni mese dell'anno 2009, sono state calcolate le percentuali di ritorni aciclici di primo tipo RA1 relativamente alle inseminazioni avvenute, secondo la formula:

$$\%RA1IA_{mese} = n_{RA1}_{mese} / n_{inseminazioni\ avvenute}_{mese} * 100$$

Considerando tutte le aziende come un unico campione statistico, è stata confrontata la prevalenza di VtotFA osservata nei mesi di luglio, agosto e settembre, la prevalenza di RC1FA osservata nei mesi luglio e agosto e la prevalenza di RA1FA osservata nei mesi di luglio, agosto, settembre e ottobre, rispetto ai restanti mesi dell'anno.

Infine, la prevalenza di RC1FA e di RA1FA nei mesi di luglio, agosto e settembre è stata confrontata tra le aziende in cui era presente un impianto di raffrescamento in sala parto, tipo *cooling system*, o comunque un sistema di ventilazione molto efficiente sia in sala parto che in gestazione e le aziende non dotate di questi impianti di refrigerazione ritenuti adeguati.

In tutti i confronti statistici illustrati, sono avvenuti utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis con livello di significatività  $p < 0.01$ .

## RISULTATI

In tabella 2 vengono riportati i riepiloghi mensili dei dati di tutte le 20 aziende analizzate, suddivise secondo le varie classi di ritorno.

**Tabella 2:** Raccolta dei dati delle inseminazioni totali (IA tot), totale delle scrofe vuote (N°tot vuote), Ritorni ciclici di 1° tipo (RC1), Ritorni aciclici di 1° tipo (RA1), Ritorni aciclici di 2° tipo (RA2) e Ritorni ciclici di 2° tipo (RC2) di tutte le 20 aziende analizzate.

**Table 2:** Data collection of total insemination (AI tot), total number of empty sows (empty tot), cyclical returns type 1 (RC1), acyclic returns type 1 (RA1), acyclic returns type 2 (RA2) and cyclical returns of type 2 (RC2) of all 20 analyzed farms.

Mesi	N°IA tot	N° tot vuote	RC1	RA1	RA2	RC2
			18-23	24-30	31-38	39-44
Gen	3932	546	154	126	29	26
Febb	3845	509	182	98	26	24
Mar	4424	600	169	117	39	35
Apr	4109	499	167	118	24	21
Mag	4277	597	215	111	29	32
Giu	4406	607	220	143	28	29
Lug	4046	794	286	162	48	31
Ago	4356	775	295	192	33	46
Set	4438	781	237	186	61	39
Ott	4464	705	197	180	54	48
Nov	4438	666	225	126	42	44
Dic	4313	694	218	142	31	27
<b>Totali</b>	<b>51048</b>	<b>7773</b>	<b>2565</b>	<b>1701</b>	<b>444</b>	<b>402</b>

La tabella 3 mostra i valori in percentuale delle varie classi di ritorno rispetto al totale delle inseminazioni di ciascun mese (tabella 3).

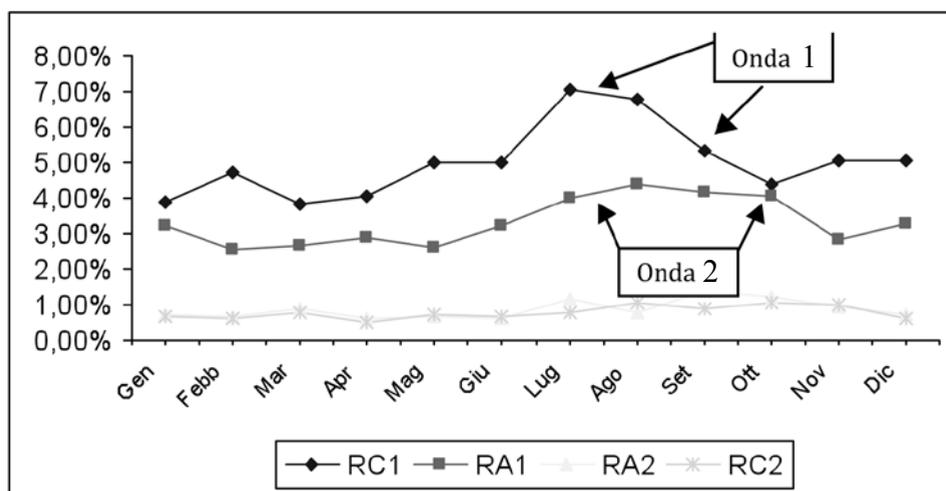
**Tabella 3:** *Distribuzione in percentuale delle varie classi di ritorni rispetto alle IA totali.*  
**Table 3:** *Percentage distribution of the various return classes on total IA.*

Mese	RC1	RA1	RA2	RC2
	18-23	24-30	31-38	39-44
Gen	3,92%	3,20%	0,74%	0,66%
Febb	4,73%	2,55%	0,68%	0,62%
Mar	3,82%	2,64%	0,88%	0,79%
Apr	4,06%	2,87%	0,58%	0,51%
Mag	5,03%	2,60%	0,68%	0,75%
Giu	4,99%	3,25%	0,64%	0,66%
Lug	7,07%	4,00%	1,19%	0,77%
Ago	6,77%	4,41%	0,76%	1,06%
Set	5,34%	4,19%	1,37%	0,88%
Ott	4,41%	4,03%	1,21%	1,08%
Nov	5,07%	2,84%	0,95%	0,99%
Dic	5,05%	3,29%	0,72%	0,63%

Dalla tabella 3 è stato ricavato il grafico 1 per evidenziare l'andamento delle varie classi di ritorno nel corso dell'anno.

**Grafico 1:** *Andamento percentuale delle classi di ritorni, rispetto alle inseminazioni totali, nel corso dell'anno.*

**Graph 1:** *Variation in percentage of return classes on total inseminations during yaer 2009*



In totale, si sono verificati 2.145 RA, tra cui quelli di primo tipo (RA1) sono risultati 1.716 (80%) mentre quelli di secondo tipo (RA2) sono risultati 444 (20%). La differenza statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) indica che gli RA1 sono più frequenti degli RA2.

In tabella 4, sono riassunte le percentuali medie osservate nei mesi estivi considerati per ciascun parametro, relativamente al numero di scrofe vuote, il numero di ritorni ciclici e di ritorni aciclici rispetto al numero di inseminazioni eseguite nel mese. In media, il numero di scrofe vuote rispetto al totale delle scrofe inseminate (Vtot IA) è risultato significativamente maggiore nei mesi di luglio, agosto e settembre rispetto ai restanti mesi dell'anno ( $p < 0.01$ ). Così come il numero medio di RC1, rispetto al numero di inseminazioni eseguite nel mese (RC1IA) è risultato significativamente maggiore nei mesi di luglio e agosto rispetto ai restanti mesi dell'anno ( $p < 0.01$ ). Infine, anche il numero di RA1, sempre rispetto al numero delle inseminazioni eseguite nel mese (RA1IA), è risultato significativamente maggiore nei mesi di luglio, agosto, settembre e ottobre.

**Tabella 4:** Parametri aziendali confrontati nei mesi estivi rispetto ai restanti mesi dell'anno. A lettere in esponente differente, corrisponde differenza statisticamente significativa nelle percentuali medie osservate ( $p < 0.01$ ).

**Table 4:** Business metrics compared in the summer months than other months of the year. Different letters in superscript corresponds significantly difference in mean rates observed ( $p < 0.01$ )

Vtot IA	n	Mean	Std
Vtot IA <sub>ott-giu</sub>	180	12.3% <sup>a</sup>	0.06
Vtot IA <sub>lug-set</sub>	60	16.3% <sup>b</sup>	0.06
RC1 IA <sub>set-giu</sub>	200	4.4% <sup>a</sup>	0.03
RC1 IA <sub>lug-ago</sub>	40	6.3% <sup>b</sup>	0.04
RA1 IA <sub>nov-giu</sub>	160	2.7% <sup>a</sup>	0.02
RA1 IA <sub>lug-ott</sub>	80	3.8% <sup>b</sup>	0.02

In tabella 5 abbiamo analizzato le varie aziende distinguendole in base alla presenza di sistemi di raffrescamento (vedi materiali e metodi). Sono stati analizzati solo i mesi di luglio, agosto e settembre. Le 8 aziende dotate di sistema di raffrescamento, hanno registrato un numero significativamente inferiore sia di RC1 che di RA1, rispetto alle 12 aziende sprovviste di sistema di raffrescamento.

**Tabella 5:** Percentuale media di ritorni ciclici e di ritorni aciclici di primo tipo rispetto alle inseminazioni avvenute nei mesi di luglio, agosto e settembre nelle aziende dotate di un sistema di raffrescamento (8 aziende), rispetto alle aziende giudicate inadeguate (12 aziende).

**Table 5:** Average percentage of cyclical returns and acyclic returns of first type respect to inseminations occurred during July, August and September in farms with a cooling system (8 companies), compared to farms judged inappropriate (12 companies).

RC1/FAtot nei mesi lug ago set	Aziende	n	mean	Std
Gruppo 1-RC1IA <sub>Scarso raffrescamento</sub>	12	36	6.4% <sup>a</sup>	0.03
Gruppo 2-RC1IA <sub>Buon raffrescamento</sub>	8	24	4.9% <sup>b</sup>	0.04
Gruppo 1-RA1IA <sub>Scarso raffrescamento</sub>	12	36	4.3% <sup>a</sup>	0.02
Gruppo 2-RA1IA <sub>Buon raffrescamento</sub>	8	24	3.2% <sup>b</sup>	0.03

## DISCUSSIONE

Il grafico 1 mette in evidenza, in un campione di oltre 18.000 scrofe presenti in 20 allevamenti del nord Italia e per l'anno 2009, la comparsa della Sindrome dell'Infertilità Stagionale (SIS). Sembra effettivamente che le sue due componenti (Complesso dell'Infertilità Estiva -CIE- e Sindrome degli Aborti Autunnali-SAA) si continuino l'una nell'altra come due ondate successive. La prima (relativa agli RC1), collocata fra luglio e settembre; la seconda (relativa agli RA1) sfasata un poco oltre (luglio-ottobre), a conferma della sua componente autunnale.

Come già evidenziato in una nota preliminare a questo studio (Mazzoni C. et al. 2010), scomponendo i ritorni aciclici totali (RA) in due categorie (RA1: 24-30 giorni; RA2: 31-38 giorni) è possibile osservare una netta prevalenza del numero di RA1 rispetto agli RA2, a conferma del fatto che la fase embrionale della gestazione mostra una maggior labilità rispetto a quella fetale (mineralizzazione del tessuto osseo attorno ai 35 giorni nel suino) (Martinat-Botté F., et al. 1998).

Un secondo aspetto, noto da molto tempo, è che i ritorni nei mesi estivi hanno un peso maggiore rispetto agli altri mesi dell'anno (Love R.J., 1978). Scomponendo questa infertilità totale nelle sue due maggiori componenti (RC1 ed RA1), emerge che gli RC1 aumentano in modo significativo nei mesi di luglio e agosto, mentre gli RA1, espressione di un riassorbimento embrionale, tendono a mantenersi elevati sino ad ottobre ( $p=0.02$ ). Inoltre nella patogenesi di questi ultimi, la componente stagionale sembra avere un ruolo maggiore di quanto non avvenga per gli RC1 (Maes, 2010).

Un terzo aspetto che emerge da questa ricerca è la maggior fertilità estiva degli allevamenti che presentano un buon sistema di raffrescamento (*cooling system*) tanto delle sale parto quanto del primo terzo della gestazione. E' bene precisare che questa suddivisione delle aziende si basa su valutazioni di carattere strutturale/zootecnico piuttosto che su serie storiche di temperature registrate. Inoltre, non è facile separare l'effetto primario di controllo delle temperature da quello secondario dei livelli di ingestione alimentare in sala parto, eventi tra loro strettamente correlati (Eissen J.J. et al., 2000). Proprio uno scarso consumo di alimento, infatti, può determinare, sia durante la lattazione che nelle prime settimane di gestazione, una ridotta secrezione di LH, con ripercussioni negative sulla sopravvivenza embrionale (Prunier et al., 1996; Peltoniemi et al., 2000). E' la cosiddetta "teoria dell'LH" (Martineau, 2003), formulata nel tentativo di spiegare come mai, in alcune scrofe durante il periodo estivo, si assista ad una caduta dei livelli di progesterone ( $P_4$ ), prodotto nel suino solo dai corpi lutei gravidici sotto l'effetto, appunto, dell'LH (Kirkwood, 2002)

Secondo l'esperienza di uno degli autori, l'efficacia di un buon sistema di raffrescamento non dovrebbe essere valutata nel periodo più caldo (luglio ed agosto), ma nel contesto dei mesi che lo precedono e lo seguono (giugno e settembre/ottobre). In effetti, è difficile pensare che, con temperature esterne attorno ai 36-38°C, quelle interne scendano sotto i 32-34°C, cioè in pieno *range* di stress termico per la scrofa. Vale però la pena sottolineare che queste temperature vengono raggiunte per brevi periodi, giorni o al massimo settimane. Viceversa nel contesto dei mesi precedenti e successivi, quando le temperature oscillano intorno ai 28-30°C, i sistemi di raffrescamento riescono, di solito, ad abbassare le temperature interne al di sotto della soglia di stress termico.

Se questa teoria trovasse conferma, si potrebbe ipotizzare per la SIS una patogenesi da "accumulo", nella quale, raggiunto gradualmente il livello oltre cui non è più possibile una compensazione, le "rottture" di alcuni soggetti si manifestino con la comparsa dei disordini riproduttivi sopra menzionati.

Verrebbe così a prendere corpo l'ipotesi di Kirkwood, il quale suggerisce l'esistenza di *sottopopolazioni* di scrofe particolarmente sensibili allo stress termico. Più precisamente, sarebbe l'integrità dei corpi lutei (CL) di queste scrofe ad essere intaccata, secondo modalità

ancora non chiarite, con l'effetto finale dell'interruzione di gravidanza (Kirkwood R. 2002, 2003). Questa genesi endocrina concorda con il quadro clinico, che spesso vede le scrofe in corso di riassorbimento/aborto normotermiche e con appetito conservato, rendendo poco percorribile l'ipotesi infettiva così spesso evocata (Sanford S.E. 1982, Levis D.G. 2001, Martineau G.P. 2003).

## CONCLUSIONI

Confermando quanto già descritto in precedenza (Mazzoni C. et al. 2010), questa ricerca evidenzia che circa l'80% dei ritorni accertati entro i 44 giorni di gestazione (4266/5112=83,4%), appartiene alla categoria dei ritorni ciclici di 1° tipo (fra i 18 ed i 23 giorni, 2565/5112=50,2%) e a quella dei ritorni aciclici di 2° tipo (fra i 24 ed i 30 giorni, 1701/5112=33,2%).

Questo dato merita, a nostro avviso, un'attenta riflessione, soprattutto in vista dell'ormai prossima applicazione della normativa sul benessere dei suini, a partire dal 2013. L'obbligo di imbrancare scrofe e scrofette alla fine della quarta settimana di gestazione, in un periodo dove appare ancora elevata la possibilità di mortalità embrionale (almeno nei mesi estivi/autunnali), dovrà spingere gli allevatori e i tecnici del settore a cercare soluzioni per contenere i vari stress di allevamento. Quadri clinici come la SIS, che rientrano nel grande capitolo della *patologia multifattoriale condizionata*, saranno diagnosticabili più facilmente incrociando i dati produttivi d'allevamento con i sintomi raccolti all'esame clinico, e potranno essere contrastati efficacemente solo con un approccio di tipo preventivo, che metta in risalto, azienda per azienda, i vari fattori di rischio presenti (Madec F., et al. 2002).

## BIBLOGRAFIA:

Almond G.W. (1992) "Factors affecting the productive performance of the weaned sows". In Tubbs RC and Leman AD (Eds.), *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, Swine reproduction*, Saunders Company, Philadelphia, 503-515

Almond G.W., Friendship R.M., Bosu W.T.K. (1985) "Autumn abortion in sows", *Can. Vet. J.*, 26, 162.2

Ashworth C. (2006) "Reproduction", in Kyriazakis I., Whittemore C.T. "Whittemore's science and practice of pig production", 3<sup>th</sup> ed., Oxford, Blackwell Publishing, 104-147

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*, 7<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Ames, 88-137

Eissen J.J., Kanis E., Kemp B. (2000) "Saw factors affecting voluntary feed intake during lactation", *Livestock Prod. Sci.*, 64: 147-165

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

- Love R.J. (1978). Definition of a seasonal infertility problem in pigs. *Vet Rec*, 103, 443-446
- Madec F., Buddle J.R., (2002) "A reflection on the strategies for tackling multifactorial disease problems in pig, with specific reference to post-weaning enteric disorders", *Proc. of the 17<sup>o</sup> IPVS Congress, Ames, vol. 1*, 113-120
- Maes, D. (2009). "Non-infectious reproductive problems in the sow: an overview", *Proceedings 1<sup>st</sup> 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 sows", 10<sup>th</sup> International Symposium on Pig Reproduction and Artificial Insemination, Rome 5-7 May.
- Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Raffi V., Scollo A., Bonilauri P. (2010). "Analisi dei ritorni nella scrofa: studi preliminari", XXXVI Meeting Annuale SIPAS, Montichiari (BS) 25-26 marzo, 347-355
- Mechler D.W. (2002) "Seasonal infertility: early planning steps to minimize production effects", *Swine Disease Conference for Swine Practitioners 2002*, Iowa State University, 131-136
- Muirhead M.R., Alexander T.J.L. (1997) "Managing Pig Health and the Treatment of Disease", 1<sup>a</sup> ed., 5 M Enterprises Ltd, UK.
- Peltoniemi O.A.T., Love R.J., Heinonen M., Tuovinen V., Saloniemi H. (1999) "Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study", *An Reprod Sci*, 55, 47-61
- Peltoniemi O.A.T., Tast A., Love R.J. (2000) "Factor effecting reproduction in pig: seasonal effect and restricted feeding of the pregnant gilt and sow". *Ani. Reprod. Sci.*, 60: 173-184
- Prunier A., Quesnel H., Messias de Braganca M., Kermabon A.Y. (1996) "Environmental and seasonal influences on the return-to-estrus after weaning in primiparous sows: a review". *Livestock Prod. Sci.*, 45: 103-110.
- Reilly J.D., Roberts A.J. (1991) "An investigation into summer infertility in a commercial pig unit", *Pig Vet. J.*, 27, 157-168
- Sanford S.E. (1982) "Fall abortions in sows", *Can.vet.J.* 23, 36
- Thacker B.J. (2002) "Seasonal infertility: management practices-causes and fixes", *Swine Disease Conference for Swine Practitioners 2002*, Iowa State University, 123-130

# INDUZIONE DEL PARTO NELLA SCROFA CON PROTOCOLLO FARMACOLOGICO “AD ALTA SINCRONIZZAZIONE”

## *FARROWING INDUCTION WITH AN HIGH LEVEL OF SYNCHRONIZATION*

RAFFI V.<sup>1</sup>, DONNA R.<sup>1</sup>, MAZZONI C.<sup>1</sup>, TONON F.<sup>1</sup>, BORRI E.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>3</sup>,  
BONILAURI P.<sup>2</sup>, GHERPELLI M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Veterinario libero professionista Suivet;*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;*

<sup>3</sup> *Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dip. Scienze Animali.*

**Parole chiave:** Scrofa, Induzione, Sincronizzazione, Parto, PGF<sub>2α</sub>, Ossitocina

**Keywords:** Sow, Induction, Synchronization, Parturition, PGF<sub>2α</sub>, Oxytocin

**Riassunto.** L'induzione/sincronizzazione farmacologica del parto nella scrofa rappresenta una tecnica molto utilizzata, soprattutto negli allevamenti industriali di grandi dimensioni. I protocolli descritti in letteratura, basati sull'utilizzo delle prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), sole od associate all'ossitocina, riportano nella maggioranza dei casi valori di sincronizzazione compresi tra il 75 e l'85% in orario lavorativo. Nel presente lavoro vengono analizzati i dati relativi a tre aziende italiane nelle quali si è applicato un protocollo di induzione modificato secondo l'esperienza degli Autori che si basa sulla doppia somministrazione di PGF<sub>2α</sub> il giorno precedente la data parto prevista (d0), seguito dalla somministrazione di ossitocina la mattina seguente (d1). I dati ottenuti permettono di definire questo protocollo di induzione “ad alta sincronizzazione”, in quanto circa il 90% delle scrofe trattate presenta il parto durante le ore lavorative dedicate all'assistenza da parte di personale specializzato.

**Abstract.** Farrowing-induction/synchronization is a very used technique, especially in piggery organized in bands. Prostaglandin is the main drug used to farrowing-induction, and the protocols reported in literature recommend the injection of a single or split dose the day before due data, followed, in the case of the single dose, by injection of oxytocin the day of parturition. These protocols result in approximately 75-85% of sows farrowing the next working day. In this work we analyze data from three Italian farms where we utilize a modified protocol previously reported by Authors. This procedure involves the use of a split dose of prostaglandin the day before due data (d0), followed by injection of oxytocin the morning of parturition (d1). The data collected allow to define this induction protocol like an “high level of synchronization”, in fact about 90% of sows farrowing the next working day when the qualified staff supervise the process.

### INTRODUZIONE

L'induzione/sincronizzazione farmacologica del parto rappresenta una tecnica ampiamente collaudata nell'allevamento industriale del suino. Questo perché, se associata ad un'adeguata assistenza da parte del personale d'azienda, apporta numerosi vantaggi gestionali/economici: riduzione dei suinetti nati-morti, riduzione dei parti nel fine settimana e durante le ore notturne, tempestivi interventi salvavita sui suinetti e sulle scrofe, ottimizzazione delle successive adozioni e degli interventi di routine sui suinetti ed, infine, una maggiore omogeneità d'età allo svezzamento (6;17). D'altro lato, esistono anche degli svantaggi: costo dei farmaci utilizzati, costi relativi alla formazione del personale, oltre alla possibilità di avere parti prolungati o

anticipati con conseguente nascita di suinetti poco vitali, di taglia ridotta o *splayleg* (11). Per ovviare a questo problema, l'induzione deve essere effettuata al massimo due giorni prima della data parto media prevista in ogni singola azienda, avendo cura di conteggiare come "giorno 1" quello della prima inseminazione (14;15).

Per quanto concerne le primipare, essendo animali caratterizzati da un'elevata variabilità nella durata della gestazione e da un peso medio della covata inferiore, molti Autori sono concordi nel circoscrivere l'induzione solo ai casi in cui non si osservi parto spontaneo al superamento del 116° giorno dalla prima inseminazione (8).

Tutti i protocolli di induzione/sincronizzazione del parto nella scrofa prevedono l'utilizzo delle prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), associate o meno ad altri farmaci (in particolare l'ossitocina), somministrate solitamente la mattina del giorno che precede la data parto prevista.

I protocolli di sincronizzazione più frequentemente descritti in letteratura ed utilizzati in campo sono riportati in Tabella 1, insieme al valore percentuale dei parti attesi in orario lavorativo (durata media gestazione pari a 115 giorni) (10).

**Tabella 1:** *protocolli di sincronizzazione più utilizzati*

**Table 1:** *synchronization protocols widely used*

114°d mattino	114°d pomeriggio	115°d mattino (parto previsto)	Parti previsti (% al 115°d)
$PGF_{2\alpha}$ h.8.00	-	Ossitocina h.8.00	75-80% h.8.30-13.00
$PGF_{2\alpha}$ h.8.00	$PGF_{2\alpha}$ h.14.00	-	80-85% h.8.30-18.00

Come si può vedere, valori intorno all'80% di scrofe che rispondono al trattamento sono da ritenere un successo e hanno rappresentato il target ricercato per anni dagli stessi Autori nella loro attività di campo.

Per quanto riguarda la via di somministrazione, le  $PGF_{2\alpha}$  oltre alla tradizionale via intramuscolare (IM) nella regione del collo a dosaggio pieno, possono essere inoculate anche per via perianale (PA) e addominale (AB) a metà dosaggio, oppure per via vulvo-mucosale (VM), dimezzando ulteriormente il dosaggio, sino ad un quarto della dose consigliata per via IM nel collo, senza differenze significative sui risultati ottenuti (1;9;4). Ciò, ovviamente, permette di ridurre gli elevati costi legati all'utilizzo di questi farmaci su larga scala.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere i risultati ottenuti in tre allevamenti italiani con l'applicazione di un protocollo di induzione/sincronizzazione modificato secondo l'esperienza degli Autori che, per l'elevata percentuale di scrofe che partoriscono beneficiando di assistenza in orario lavorativo, è stato definito "ad alta sincronizzazione".

## **MATERIALI E METODI**

Nel presente lavoro sono stati analizzati i dati relativi alla induzione/sincronizzazione di 2849 scrofe in tre aziende suinicole (Azienda A, Azienda B e Azienda C), localizzate nella Pianura Padana e distribuite fra le province di Cremona e Brescia, con una consistenza numerica complessiva di circa 3900 scrofe. Il tipo di produzione è per tutte a ciclo aperto con organizzazione interna della rimonta.

Due delle aziende considerate (A e B) sono gestite in banda settimanale, allevano scrofe dello stesso ceppo ibrido olandese e hanno una durata media della gestazione di 114 giorni; la terza azienda (C) è invece gestita in banda bi-settimanale, alleva scrofe di ceppo ibrido inglese e ha una durata media della gestazione di 115 giorni.

Il protocollo messo a punto e utilizzato nel corso della normale attività lavorativa prevedeva, per tutte le aziende considerate, la somministrazione delle PGF<sub>2α</sub> il giorno precedente la data parto prevista (d0, pari al 113° giorno per le aziende A e B, 114° giorno per l'azienda C), mediante due somministrazioni per via perianale di 1 mg di alfaprostol (0,5 ml GABBROSTIM®) distanziate tra loro di sei ore (h.8.00 e h.14.00 rispettivamente). Il giorno successivo (d1), alla ripresa dell'attività lavorativa prevista per le h.7.00, alle scrofe che non avevano ancora iniziato il parto venivano somministrate 15 UI di ossitocina, sempre per via perianale (1,5 ml IZOSSITOCINA® per le aziende A e B; 1,5 ml NEUROFISIN® per l'azienda C).

Le scrofe che hanno iniziato il parto 0-9 ore dopo la prima somministrazione di PGF<sub>2α</sub> sono state escluse dalla prova, in quanto riteniamo pressoché impossibile distinguere i parti già naturalmente in corso da quelli indotti. Sono state escluse anche le primipare in quanto non sottoposte a induzione/sincronizzazione.

Le scrofe incluse nella prova sono state classificate nel seguente modo:

- precoci, cioè quelle che hanno iniziato a partorire 10-23 ore dalla prima somministrazione di PGF<sub>2α</sub>, senza ricevere l'ossitocina;
- positive all'ossitocina, cioè le scrofe che hanno iniziato a partorire dopo l'iniezione di ossitocina ed entro le ore 12.00 del giorno d1, (23-28 ore dalla prima somministrazione di PGF<sub>2α</sub> e 0-5 ore dalla somministrazione di ossitocina);
- negative, le scrofe che non hanno risposto alla induzione/sincronizzazione, cioè quegli animali che non avevano ancora iniziato a partorire entro le ore 12.00 del giorno parto previsto.

L'assistenza ai parti è stata effettuata da personale aziendale appositamente formato, coadiuvato da un tecnico esterno (nella fattispecie un medico veterinario), che collaborava col personale durante la mattina del giorno d1. Gli animali sono stati monitorati con una frequenza di circa 20-30 minuti, e all'occorrenza venivano effettuate le manualità ostetriche del caso, piuttosto che altri interventi salvavita per i suinetti neonati a rischio di mortalità. I dati relativi ai ritmi del parto e ai trattamenti eseguiti sulle scrofe durante l'assistenza sono stati registrati su apposite schede, collocate singolarmente dietro ciascuna gabbia parto (10).

## ANALISI STATISTICA

Il numero di scrofe che hanno iniziato a partorire entro le ore 12.00 del giorno previsto per l'assistenza (d1) rispetto al numero di scrofe attese secondo i protocolli classici riportati in letteratura (Tab.1), è stato confrontato mediante l'utilizzo del test  $\chi^2$  con livello di significatività  $p < 0.01$ .

Più specificamente, la percentuale di scrofe che hanno partorito entro le ore 12.00 del giorno d1 osservata in questo studio è stata messa a confronto con:

1. un modello teorico dell'80% di scrofe attese per il trattamento con un'iniezione di PGF<sub>2α</sub> seguito da ossitocina (modello 1PGF + oxy);
2. un modello teorico dell'85% di scrofe attese per il protocollo con la doppiaprostaglandina (modello 2PGF) (2).

## RISULTATI

Come riportato in Tabella 2, su 2849 scrofe incluse, sottoposte ad induzione/sincronizzazione in tre allevamenti con lo stesso tipo di protocollo, 726 scrofe, pari al 25,5%, hanno partorito in un intervallo compreso tra le 10 e le 23 ore dopo la prima prostaglandina (precoci); 1829 scrofe, pari al 64,2%, hanno partorito entro le ore 12.00 del giorno parto previsto (d1), dopo somministrazione di ossitocina (positive all'ossitocina); 294 scrofe, pari al 10,3%, non hanno iniziato il parto entro le ore 12 del giorno d1 (negative).

Sommando gli animali delle prime due categorie, cioè quelli che hanno partorito entro le ore 12.00 del giorno d1, si ottiene un valore pari all'89,7% di risposta al protocollo applicato.

In Tabella 3 e 4 vengono riportati i dati relativi alle singole aziende. Nel dettaglio, su 1922 scrofe incluse nell'allevamento A, 1697 scrofe (88,2%) hanno partorito entro le ore 12.00 del giorno d1, rispetto ad un numero di scrofe attese pari a 1537 (80%) con il modello 1PGF + oxy. Questo incremento, rispetto al valore atteso, è risultato statisticamente significativo ( $p < 0.01$ ). Così come significativo è risultato il numero di scrofe sincronizzate, sempre nell'allevamento A, rispetto alle scrofe attese con il modello 2PGF (85%, 1633 attese, 1697 osservate,  $p < 0.01$ ). Nell'allevamento B i dati mostrano lo stesso andamento (stessi livelli di significatività rispetto alle attese), mentre nell'allevamento C le scrofe positive al trattamento (89,2% delle incluse) risultano significativamente maggiori soltanto rispetto ad una proporzione attesa dell'80% (mod.1PGF + oxy), ma non nei confronti della proporzione dell'85% prevista per il modello 2PGF (tab.4).

**Tabella 2:** *risposta al protocollo di induzione/sincronizzazione*

**Table 2:** *farrowing response to the induction/synchronization protocol*

<b>TOTALE Scrofe incluse</b>	<b>Precoci (solo PGF2<math>\alpha</math>)</b>	<b>Positive all'ossitocina</b>	<b>Negative</b>
2849 (100%)	726 (25,5%)	1829 (64,2%)	294 (10,3%)

**Tabella 3:** *risposta al protocollo di induzione/sincronizzazione delle singole aziende*

**Table 3:** *single farm's farrowing response to the induction/synchronization protocol*

	<b>TOTALE Scrofe incluse o trattate</b>	<b>Precoci (solo PGF2<math>\alpha</math>)</b>	<b>Positive all'ossitocina</b>	<b>Negative</b>
A	1922 (100%)	468 (24,3%)	1229 (63,9%)	225 (11,7%)
B	576 (100%)	151 (26,2%)	394 (68,4%)	31 (5,4%)
C	351 (100%)	107 (30,5%)	206 (58,7%)	38 (10,8%)

**Tabella 4:** *scrofe che hanno iniziato a partorire entro le ore 12.00 del giorno d1, e scrofe attese secondo letteratura, per i protocolli di sincronizzazione con una somministrazione di PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  seguita da ossitocina (80%) o con due somministrazioni di PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (85%). <sup>a,b</sup> a lettera in apice differente, corrisponde differenza statisticamente significativa (test  $\chi^2$   $p < 0.01$ ) rispetto all'atteso secondo letteratura.*

**Table 4:** *sows farrowed onset not later than 12.00 a.m. of the due date d1 observed and 80% of sows expected using one injection of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  followed by oxytocin and 85% of sows expected using only 2 injections of PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . <sup>a,b</sup> different means, that significantly different observed between what observed and what expected with  $\chi^2$  test with  $p < 0.01$ .*

	<b>TOTALE Scrofe incluse o trattate</b>	<b>Scrofe che hanno risposto all'induzione/ sincronizzazione</b>	<b>Scrofe attese (80% - mod. 1PGF + oxy)</b>	<b>Scrofe attese (85% - mod. 2PGF)</b>
TOT	2849 (100%)	2555 <sup>a</sup> (89,7%)	2279 <sup>b</sup>	2421 <sup>b</sup>
A	1922 (100%)	1697 <sup>a</sup> (88,2%)	1537 <sup>b</sup>	1633 <sup>b</sup>
B	576 (100%)	545 <sup>a</sup> (94,6%)	460 <sup>b</sup>	489 <sup>b</sup>
C	351 (100%)	313 <sup>a</sup> (89,2%)	280 <sup>b</sup>	298 <sup>a</sup>

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il principale obiettivo dell'induzione farmacologica dei parti è quello di riuscire a sincronizzarli durante il normale orario di lavoro, in modo tale da permettere una efficace assistenza sia delle scrofe che dei suinetti neonati.

I protocolli esistenti prevedono l'utilizzo delle prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) o dei loro analoghi (20), che vengono somministrati di solito il giorno precedente la data parto media prevista per ciascuna azienda. A seconda dei casi, si possono applicare vari protocolli, due dei quali sono ormai consolidati sia in letteratura che nella pratica: un'unica somministrazione di  $PGF_{2\alpha}$  seguita a 24 ore di distanza dall'ossitocina (modello 1PGF + oxy) (3;7;19) o una duplice somministrazione di  $PGF_{2\alpha}$  (modello 2PGF) distanziata di 6 ore (7;10;11)

Questi protocolli consentono una sincronizzazione dei parti nell'orario di lavoro che si aggira attorno all'80%, così come emerge da vari dati bibliografici e dall'esperienza pluriennale degli Autori in questo campo (11).

Lo scopo di questo lavoro è quello di testare in condizioni di campo un protocollo di induzione modificato che permetta una sincronizzazione ancora più efficace, in modo tale da concentrare la quasi totalità dei parti durante la mattinata di lavoro, e utilizzare poi il pomeriggio per svolgere le altre mansioni richieste dalla sala parto, come i baliaggi e i trattamenti sui suinetti più piccoli e deboli, a maggior rischio di mortalità perinatale.

In pratica, questo protocollo deriva dalla fusione dei due sistemi di induzione più utilizzati, ed associa i vantaggi della doppia prostaglandina al giorno 0 (maggior effetto luteolitico) con quelli dell'ossitocina al giorno 1 (effetto contrattile sul miometrio).

Alcune critiche possono essere mosse nei confronti dell'utilizzo dell'ossitocina, come dimostrano diversi studi nei quali si è registrato un aumento della natimortalità, rendendo spesso necessario un numero più elevato di esplorazioni manuali del canale del parto (12;13). In effetti, l'utilizzo di ossitocina può determinare un allungamento dei tempi del parto, in particolare dopo l'espulsione del primo suinetto o di quelli immediatamente seguenti (19). Le cause non si conoscono ancora con certezza, ma verosimilmente sono legate al fatto che la somministrazione di ossitocina viene effettuata prima dell'apertura della cervice, provocando uno stato di sofferenza da parte della scrofa durante l'espulsione del primo suinetto. In effetti, quando l'ossitocina viene somministrata a dosaggio adeguato dopo la nascita del primo suinetto e la presumibile completa dilatazione della cervice, la durata del parto si riduce e non si osservano rallentamenti (12). In ogni caso la somministrazione dell'ossitocina, dopo le due  $PGF_{2\alpha}$ , permette di migliorare la sincronizzazione evidenziando quadri da stress decisamente modesti. Questo fatto suggerisce che un numero elevato di scrofe abbia già la cervice aperta, quindi sia prossima al parto (2).

Risulta comunque indispensabile che le scrofe sottoposte a questo metodo di induzione/sincronizzazione (come, del resto, a qualsiasi altro) ricevano un'adeguata assistenza, operata da personale correttamente formato che si dedichi esclusivamente a tale mansione durante la giornata dei parti. In effetti, nelle aziende prese in esame, che stanno continuando ad applicare il protocollo oggetto di questo studio nella normale attività lavorativa, seguito da un'appropriata assistenza del parto, l'incidenza di natimortalità si è attestata attorno al 5-6%, come riportato in tabella 5. Questi dati non sono sovrapponibili a quelli analizzati nel presente lavoro e quindi non sono oggetto di elaborazione o discussione, ma, vista la vastità del campione e la ripetizione costante del protocollo in oggetto, vengono riportati come rappresentativi dell'andamento produttivo delle tre realtà aziendali. È comunque importante sottolineare che percentuali come queste, pur essendo migliorabili, rientrano nei parametri zootecnici di riferimento e ci permettono di fare un'altra considerazione relativamente a quel circa 25% di parti definiti "precoci". Effettivamente, questi possono essere parti notturni, quindi con assistenza nulla, ma, in realtà, l'esperienza di campo ci dice che nella quasi totalità dei casi non è così. La maggior parte di questi inizia effettivamente di notte, ma si conclude nel corso della mattina successiva, favorendo così l'assistenza del personale che nel frattempo si è recato sul posto di lavoro. L'osservazione non deve essere sottovalutata poiché, come sappiamo, sono proprio gli ultimi suinetti quelli a maggior rischio di natimortalità (16).

**Tabella 5:** dati relativi ai parti registrati nel periodo settembre-dicembre 2010

**Table 5:** farrowing's data during the period September to December 2010

	<b>Parti totali</b>	<b>Nati totali (NT/PT)</b>	<b>Nati vivi (NV/PT)</b>	<b>Nati morti (NM/PT)</b>	<b>Nati morti (%)</b>
A	1335	16930 (12,7)	15868 (11,9)	1052 (0,8)	6,2%
B	984	11447 (11,6)	10843 (11)	604 (0,6)	5,2%
C	525	6610 (12,6)	6247 (11,9)	363 (0,7)	5,5%

In conclusione, il protocollo di induzione oggetto di questo studio ha dimostrato di raggiungere percentuali di sincronizzazione molto elevate (intorno al 90%), superiori in modo significativo rispetto a quelle riportate dalla maggior parte delle fonti bibliografiche e abitualmente ottenute dagli Autori nel corso degli anni precedenti. Da sottolineare che le condizioni in cui si è operato sono quelle di allevamenti intensivi di grandi dimensioni, che necessitano sempre più di una scrupolosa programmazione degli eventi e di una adeguata formazione del personale per far fronte ad un ciclo economico estremamente difficile.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bradford JR. (2000) "Getting the most from your Lutalyse® farrowing induction program". American Association of Swine Practitioners. 181-185.
2. Cassar G., Kirkwood RN., Friendship R. and Poljak Z. (2005) "Sow and litter performance following farrowing induction with prostaglandin: effect of adjunct treatments with dexamethasone or oxitocin". J. Swine Health Prod. 13(2), 81-85.

3. Dial GD., Almond GW., Hilley HD., Repasky RR and Hagan J. (1987) "Oxytocin precipitation of prostaglandin-induced farrowing in swine: determination of the optimal dose of oxytocin and optimal interval between prostaglandin F<sub>2α</sub> and oxytocin". *Am. J. of Vet. Res.* 48(6), 966-970.
4. Gunvaldsen RE., Waldner C., Harding C. (2007) "Effects of farrowing induction on suckling piglet performance". *J. Swine Health Prod.* 15(2), 84-91.
5. Holtz W., Schmidt-Baulain R., Meyer H. and Welp C. (1990) "Control of prostaglandin-induced parturition in sow by injection of the beta-adrenergic blocking agent carazolol or carazolol and oxytocin". *J. Anim. Sci.* 68, 3967-3971.
6. Holyoake PK., Dial GD., Trigg T. and King VL. (1995) "Reducing pig mortality through supervision during the perinatal period". *J. Anim. Sci.* 73, 3543-3551.
7. Kirkwood NR. and Aherne FX. (1998) "Increasing the predictability of cloprostenol-induced farrowing in sows". *Swine Health and Production.* Vol. 6, n.2, 57-59.
8. Kirkwood RN. (1999) "Farmacological intervention in swine reproduction". *Swine Health Prod.* 7(1), 29-35.
9. Kirkwood RN., Thacker PA., Aherne FX. and Goonewardene LA. (1996) "The effect of dose and route of administration of prostaglandin F<sub>2α</sub> of the parturient response of sows". *Swine Health and Production.* Vol. 4, n.3, 123-126.
10. Mazzoni C. (2007) "La gestione della sala parto". Milano, Point Veterinarie Italie.
11. Mazzoni C., Casappa P. (2009) "Il parto della scrofa nell'allevamento industriale: opzioni gestionali e razionalizzazione degli interventi in sala parto". *Rivista di Zootecnica e Veterinaria.* Vol. 41, n.2, 19-31.
12. Mota-Rojas D., Martinez-Burnes J., Trujillo-Ortega ME., Alonso-Spilsbury L., Ramirez-Necochea R., Lopez A. (2002) "Effect of oxytocin treatment in sows on umbilical cord morphology, meconium staining and neonatal mortality of piglets". *Am. J. of Vet. Res.* 63(11), 1571-1574.
13. Mota-Rojas D., Trujillo-Ortega ME., Martinez-Burnes J., Lopez A., Rosales A., Ramirez-Necochea R., Orozco H., Merino M., Alonso-Spilsbury M. (2004) "Electronic monitoring of hypoxic fetus during farrowing in sows treated with oxytocin". *IPVS Congress, Vol 2,* 497.
14. Olson G., Robine L., Auckland C., Duggan M., Chirino-Trejo M., Weber L., Rosengren L., Harding J. (2008) "Effects of farrowing induction on passive immunity, fecal *Cl. perfringens*, and liver glycogen levels in piglets". *American Association of Swine Veterinarians,* 67-68.
15. Provis PHF. (2003) "Induced farrowing: are you in control?". *Advances in Pork Production.* Vol. 14, 191-194.
16. Randall G.C.B. (1972). "Factors influencing stillbirth and prenatal mortality", *Vet. Rec.* 90, 183-186.
17. Schwartz M. (2006). "Analysis of farrowing induction". *Allen D. Leman Swine Conference.* 197-199.
18. Straw B., Bates R., May G. (2008) "Influence of method of administration of prostaglandin on farrowing and relationship between gestation length and piglet performance". *J. Swine Health Prod.* 16(3), 138-143.
19. Welp C., Jochle W. and Holtz W. (1984) "Induction of parturition in swine with a prostaglandin analog and oxytocin: a trial involving dose of oxytocin and parity. *Theriogenology* 22(5), 509-520.
20. Zhou C., Tonon F., Rossetto G., Cevidalli AE. (2006) "Comparative efficacy of cloprostenol and alfaprostol for induction of parturition in sows". *IPVS Congress. Vol. 2,* 530.

# SINDROME DELLA SECONDA FIGLIATA: ANALISI DEI DATI SU 11 ALLEVAMENTI IN ITALIA - STUDIO PRELIMINARE

## SECOND LITTER SYNDROME: ANALYSIS OF DATA BASE FROM 11 ITALIAN FARMS - PRELIMINARY STUDY

TONON F.<sup>1</sup>, MAZZONI C.<sup>1</sup>, BORRI E.<sup>1</sup>, DONNA R.<sup>1</sup>, RAFFI V.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>3</sup>, BONILAURI P.<sup>2</sup>, GHERPELLI M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Veterinario libero professionista Suivet;

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;

<sup>3</sup> Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dip. Scienze Animali.

**Parole chiave:** scrofa, sindrome, seconda figliata, fertilità

**Keywords:** sow, syndrome, second litter, fertility

**Riassunto.** La Sindrome della Seconda Figliata (SSF) è una patologia riproduttiva polifattoriale presente in molti allevamenti, soprattutto ad alta produttività. I dati, che provengono da 11 aziende del nord Italia che utilizzano lo stesso programma di gestione, ammontano ad oltre 46.000 parti e sono stati raggruppati e messi a confronto per ciascuno dei quattro anni consecutivi considerati (2006-2009). Per quanto riguarda gli indicatori di fertilità considerati (ISE, ISCU, n°IA/parto) è emersa una differenza significativa ( $p < 0,01$ ) in ciascun anno considerato tra le primipare (seconda figliata) e le scrofe più avanzate in carriera (secondipare e pluripare). La prolificità non è stata indagata e sarà oggetto di una successiva analisi dei dati.

**Summary.** The second-litter syndrome is a reproductive pathology observed in many farrowing farms, in particular is observed in farms where with high productivity are performed. Between 2006 and 2009, 46'000 birth data were collected coming from 11 farms located in the northern part of Italy. All the farms use the same reproductive management software. Data regarding fertility index as Weaning to Oestrus Interval (WOI), Weaning to Oestrus Fecundation Interval (WOFI), Farrow-to-Farrow intervals (FFI) collected allow to demonstrate, in all the considered years and for all considered parameters, significant differences ( $p < 0,01$ ) among parity 2, parity 3 and parity greater or equal to 4, sows. Prolificacy was not considered in this communication and will be the object of next data analysis.

**Summary.** The second litter syndrome is a multifactorial reproductive disease that affects many pig farms, especially at high productivity. The data, collected from 11 farms in the northern Italy that used the same farm management software, amount to more than 46.000 farrowings and have been grouped and compared for each of four consecutive years considered (2006-2009). Regarding the indicators of fertility taken into consideration (Weaning to Oestrus Interval (WOI), Weaning to Fertile Oestrus (WFOI), n°IA/farrowing) it is shown a significant difference ( $p < 0,01$ ) in each year considered between the primiparous (second litter) and sows with increasing parity (secondiparous and multiparous). The litter size has not been investigated and will be the subject of following data analysis.

### INTRODUZIONE

La Sindrome della Seconda Figliata (SSF) è una patologia di allevamento che si manifesta con problemi riproduttivi sulle scrofe primipare dopo lo svezzamento: allungamento

dell'Intervallo Svezzamento Estro (ISE), aumento dei ritorni in estro dopo la inseminazione, con conseguente aumento dell'Intervallo Svezzamento Calore Utile (ISCU) e dell'interparto, a volte associati ad una diminuzione della prolificità (nati totali) al secondo parto. Si osserva oggi con una certa frequenza, soprattutto negli allevamenti ad alta produttività (2).

E' ritenuta una sindrome polifattoriale, che riflette una minor funzionalità del sistema riproduttivo della scrofa dopo la prima lattazione, durante la quale gli animali vanno incontro, a vario grado, ad uno stato catabolico mentre sono ancora in fase di accrescimento, sia a livello di massa corporea che di organi riproduttivi (1, 2).

Scopo del presente lavoro, presentato come studio preliminare, è quello di indagare l'esistenza e la portata di questa sindrome su un campione di 11 allevamenti del nord Italia, analizzati nel corso di quattro anni consecutivi (2006-2009), per un totale di oltre 46.000 parti inclusi.

### **MATERIALI E METODI**

I dati raccolti e analizzati provengono da 11 allevamenti da riproduzione situati nel nord Italia con tipologia a ciclo aperto o chiuso. Le scrofe che vi vengono allevate appartengono a vari ceppi genetici e la rimonta è organizzata sia internamente (con nuclei di soggetti gran parentali) che esternamente, tramite l'acquisto di scrofette parentali. Gli allevamenti sono stati scelti sulla base dell'utilizzo dello stesso software gestionale (Logiporc®), con lo scopo di uniformare i metodi di calcolo degli eventi riproduttivi sottoposti ad analisi statistica.

I dati raccolti dagli elaboratori aziendali sono stati trasferiti su foglio elettronico per consentirne l'analisi statistica.

### **ANALISI STATISTICA**

Gli 11 allevamenti inclusi sono stati considerati come un unico campione statistico, tenendo separati i quattro anni solari. I dati, relativi ad ogni singola scrofa, sono stati raggruppati in tre categorie di animali, a seconda dell'ordine di parto: primipare (2), secondipare (3), pluripare (4 o più). Le scrofette non sono state incluse. I parametri riproduttivi presi in considerazione sono stati: ISE, ISCU e n° IA/parto (cioè numero di inseminazioni necessarie ad ingravidare la scrofa), confrontati secondo il valore medio.

Data la distribuzione, non normale, dei dati raccolti e la loro elevata numerosità, si è optato per l'utilizzo del test non parametrico di Kruskal-Wallis, con livello di significatività  $p < 0.01$ .

### **RISULTATI**

Le tabelle 1-4 mostrano i risultati ottenuti per ciascuno dei quattro anni presi in considerazione.

L'elevato numero dei dati ha permesso di mettere in evidenza differenze significative ( $p < 0.01$ ) per ciascuno dei parametri riproduttivi analizzati, mettendo a confronto le primipare (o scrofe di seconda figliata che dir si voglia) con le altre scrofe del campione (secondipare e pluripare).

In particolare, se si osservano le differenze nei valori assoluti, emerge che a variazioni di ISE più contenute (0,8-2,6 giorni in più a seconda degli anni tra le primipare e le pluripare) corrispondono variazioni di ISCU più accentuate (3,9-6,8 giorni in più), a conferma che la ritardata comparsa del calore dopo la prima lattazione è il primo sintomo di un funzionamento sub-ottimale dell'intero sistema riproduttivo, con un aumento significativo dei giorni improduttivi incorporati dal software proprio nell'ISCU. La maggiore infertilità registrata sulle scrofe primipare è testimoniata anche dal maggior numero medio di IA necessarie ad ingravidarle (n° IA medie/parto), valore strettamente correlato ai ritorni in estro registrati.

**Tabella 1:** indici riproduttivi relativi alle 11 aziende considerate nel periodo 2006 – 2009, suddivise per i singoli anni considerati. A lettera in apice differente corrisponde differenza statisticamente significativa ( $p < 0.01$ )

**Table 1:** reproductive index of 11 Italian farm collected between 2006 and 2009. Parity, number of sows, means Weaning to Oestrus Interval (WOI), Weaning to Fertile Oestrus (WFOI), number of artificial insemination (AI) are reported in each years. Means with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.01$ ).

2006				
Ordine parto	n°	ISE medio	ISCU medio	n° IA medie
2	4101	7.703 <sup>a</sup>	15.067 <sup>a</sup>	1.197 <sup>a</sup>
3	3345	7.625 <sup>b</sup>	12.284 <sup>b</sup>	1.131 <sup>b</sup>
4 o più	10417	6.943 <sup>c</sup>	11.233 <sup>c</sup>	1.135 <sup>b</sup>
2007				
Ordine parto	n°	ISE medio	ISCU medio	n° IA medie
2	5101	8.170 <sup>a</sup>	14.540 <sup>a</sup>	1.174 <sup>a</sup>
3	4691	6.650 <sup>b</sup>	11.559 <sup>b</sup>	1.121 <sup>b</sup>
4 o più	12765	6.406 <sup>c</sup>	9.365 <sup>c</sup>	1.093 <sup>c</sup>
2008				
Ordine parto	n°	ISE medio	ISCU medio	n° IA medie
2	3971	8.723 <sup>a</sup>	16.006 <sup>a</sup>	1.185 <sup>a</sup>
3	3648	7.319 <sup>b</sup>	12.323 <sup>b</sup>	1.132 <sup>b</sup>
4 o più	15287	6.124 <sup>c</sup>	9.213 <sup>c</sup>	1.086 <sup>c</sup>
2009				
Ordine parto	n°	ISE medio	ISCU medio	n° IA medie
2	2310	8.521 <sup>a</sup>	16.761 <sup>a</sup>	1.216 <sup>a</sup>
3	2058	7.279 <sup>b</sup>	13.159 <sup>b</sup>	1.145 <sup>b</sup>
4 o più	7732	7.617 <sup>c</sup>	11.507 <sup>c</sup>	1.123 <sup>c</sup>

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le cause del *deficit* riproduttivo che va sotto il nome di Sindrome della Seconda Figliata (SSF), ancorché non del tutto conosciute, sono da ricercare soprattutto nel periodo della prima lattazione. Qui, infatti, si sommano almeno tre fattori di rischio comuni alle giovani scrofe: necessità di nutrienti per il proprio accrescimento (oltre che per la produzione di latte), minor capacità di ingestione alimentare e minor capacità di metabolizzare le scorte di tessuto adiposo e proteico (1). Ciò determina uno stato catabolico, più o meno accentuato a livello individuale, che si riflette negativamente sull'efficienza dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (4).

I parametri aziendali che permettono di oggettivare questo fenomeno sono l'Intervallo Svezzamento Estro (ISE) e l'Intervallo Svezzamento Calore Utile (ISCU), entrambi misurati

in giorni. E' importante sottolineare che nell'ISCU viene incorporata tutta l'infertilità registrata da ogni scrofa (che abbia partorito almeno una volta) ad ogni ciclo, tradotta nei cosiddetti "giorni improduttivi", cioè tutti quelli in cui non è gravida o non allatta. Dai dati raccolti in questo studio, espressi in valore assoluto, emerge che le scrofe primipare presentano un *gap* riproduttivo che oscilla tra i 4 e i 7 giorni a seconda degli anni rispetto alle scrofe pluripare, con importanti variazioni inter-allevamento che saranno da indagare in futuro.

Per quanto riguarda l'analisi della prolificità (nati totali/parto), descritta in letteratura come possibile sintomo della SSF (3), sarà oggetto anch'essa di una successiva analisi, in quanto si ritiene che l'effetto allevamento, unito alle caratteristiche di ogni linea genetica, siano da indagare più nel dettaglio.

Infine, come in tutte le sindromi polifattoriali, la strategia di controllo della SSF si basa sulla messa in evidenza dei fattori di rischio presenti a livello aziendale e deve essere valutata su un periodo di tempo sufficientemente lungo (spesso alcuni mesi), in quanto tocca aspetti relativi all'entrata in produzione della scrofa, alla gestione della prima gravidanza e della prima lattazione (2). A supporto di tale strategia, è possibile servirsi anche di terapie ormonali di sostegno, basate sulle gonadotropine (3) o sui progestinici orali (1), ma anche questo aspetto sarà da indagare in futuro, in un'ottica di costo/beneficio.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Forgerit Y., Martinat-Botté F., Bariteau F., Corbé H., Macar C., Poirier P., Nolibois P., Terqui M. (1995). Utilisation d'un progèstagene (Regumate) au moment du tarissement de la primipare. Journées Rech Porcine en France, 27, 45-50
2. Kemp B., Soede N.M. (2004). Reproductive problems in primiparous sows. Proceedings 18<sup>th</sup> IPVS Congress, Hamburg, Vol. 2, 843-848
3. Kirkwood R.N. (1999). Pharmacological intervention in swine reproduction. Swine Health and Production, 7 (1), 29-35
4. Martineau G.P., Morvan H. (2010). Le syndrome de deuxième portée. In : Maladies d'élevage des porcs, 2ème ed., 429-431. Ed. France Agricole
5. Morrow W.E.M., Leman A.D., Williamson N.B., Morrison R.B., Robinson R.A. (1992). An epidemiological investigation of reduced second-litter size in swine. Prev. Vet. Med., 12, 15-26
6. Quesnel H., Pasquier A., Mountier A.M., Prunier A. (1998). Influence of feed restriction during lactation on gonadotropic hormones and ovarian development in primiparous sows. J. Anim. Sci., 78, 856-863

# VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA *SALMONELLA* SPP. LUNGO LA FILIERA PRODUTTIVA IN CINQUE ALLEVAMENTI SUINI DEL CENTRO ITALIA

## *OCCURENCE OF SALMONELLA SPP. IN FIVE FARROW TO FINISH PIG HERDS IN CENTRAL ITALY*

D'AVINO N.<sup>1</sup>, CUCCO L.<sup>1</sup>, CIUTI F.<sup>1</sup>, ORTENZI R.<sup>1</sup>, PANICCIA' M.<sup>1</sup>, PEZZOTTI G.<sup>1</sup>, STAFFOLANI M.<sup>1</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

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

**Parole chiave:** *Salmonella*, suino, filiera

**Key words:** *Salmonella*, swine, production chain

**Riassunto.** Il presente lavoro descrive i risultati di un'indagine sulla diffusione di *Salmonella* spp. condotta all'interno di cinque aziende a ciclo chiuso di dimensioni medio piccole del centro Italia. Il campionamento è stato effettuato lungo la filiera produttiva, dalla produzione primaria fino alla carne fresca. In tutte le aziende è stato isolato almeno uno stipte di *Salmonella* in uno dei diversi comparti della filiera: in particolare, sono stati isolate *S. Derby* nelle scrofe in gestazione, *S. Rissen* nelle stalle di sosta, variante monofasica di *Salmonella* Typhimuirum (*S. 4,(5),12:i:-*) nei suini all'ingrasso, nei linfonodi e nel contenuto intestinale al macello e nella carne. Le percentuali di positività riscontrate risultano tuttavia tendenzialmente inferiori rispetto ai dati ottenuti nel corso di indagini svolte recentemente dall'EFSA. Una giustificazione di questi risultati potrebbe trovarsi nel contenimento di alcuni fattori di rischio in grado di amplificare la contaminazione da *Salmonella* nelle fasi terminali della filiera, quali la durata e le modalità di trasporto e la gestione della sosta.

**Abstract.** The present work describes results of a survey carried in five small- medium size pig farms in central Italy, in order to determine the occurrence of *Salmonella* throughout the production chain. Samples have been collected from live animals on farms, during transport and lairage and at slaughterhouse, up to raw meat. At least one isolate of *Salmonella* has been isolated in each farm. In respect to serotypes, *S. Derby* was isolated from gestating sows, *S. Rissen* from lairage, *S. enterica* serovar 4,(5),12:i:- from finishers, intestinal contents and lymph nodes at slaughter and meat. Taken as a whole, the proportion of positives appear lower compared to what described in literature and in the results of the EFSA survey. This feature could be justified with the lower impact of those risk factors that influence *Salmonella* contamination in the last steps of the production chain, such as transport and lairage.

### INTRODUZIONE

La salmonellosi viene tuttora considerata come una delle più importanti zoonosi trasmesse attraverso gli alimenti: la carne suina, dopo le uova e la carne di pollo, viene considerata come una delle più importanti fonti di contaminazione per l'uomo. La prevalenza di *Salmonella* spp. è stata indagata nel 2007 in uno studio effettuato dall'EFSA, attraverso l'esame colturale di linfonodi al macello, rilevando una percentuale di positivi pari al 10.3% in Europa e 16.5% in Italia; in uno studio successivo, è stata valutata la prevalenza di questo agente in allevamenti di produzione e riproduzione. Sono quindi state prese

in considerazione diverse strategie d'intervento per contenere la contaminazione da *Salmonella* spp. nei prodotti di origine suina, da applicare in diversi momenti della filiera. Ai fini della circolazione di *Salmonella* spp., essa è stata suddivisa in grandi fasi: la fase di produzione primaria, la fase di trasporto e di permanenza nelle stalle di sosta, e la macellazione e lavorazione del prodotto. Nella produzione primaria, l'infezione può essere introdotta attraverso varie fonti, sia dirette che indirette, tra cui le principali sono gli animali, ad esempio le scrofette da rimonta, e l'alimento. All'interno degli allevamenti, l'infezione viene generalmente contratta dai suini dopo la messa a terra; essa viene quindi perpetuata come conseguenza di una contaminazione ambientale. Inoltre, è noto come le infezioni contratte durante il trasporto e nelle stalle di sosta siano particolarmente a rischio per la successiva contaminazione della carcassa; infatti durante queste fasi si realizza un aumento della escrezione batterica e quindi una cross-contaminazione tra partite diverse di suini (Schmidt, 2004). Infatti, è stato dimostrato come *Salmonella* spp. sia in grado di infettare i suini in un tempo inferiore alle due ore (Hurd, 2001). Pratiche igieniche non corrette durante le fasi di macellazione e trasformazione contribuiscono ulteriormente ad una contaminazione finale del prodotto. Questo quadro è ulteriormente complicato dalla struttura diversificata della filiera del suino nella Comunità Europea.

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare con metodica semi-quantitativa la presenza di *Salmonella* spp. lungo la filiera suina. L'indagine è stata svolta in allevamenti a ciclo chiuso dell'Italia centrale, con un numero di scrofe inferiore a 500, che conferivano ad un macello di piccole dimensioni e che commercializzavano in ambito regionale.

## MATERIALI E METODI

### *Allevamenti:*

Per questo lavoro sono stati selezionati cinque allevamenti a ciclo chiuso, localizzati in Italia centrale; tutte le aziende selezionate presentavano le seguenti caratteristiche: presenza di riproduttori in azienda, impiego di un macello di proprietà o di dimensioni limitate e commercializzazione dei prodotti in ambito regionale.

**Tabella 1:** *caratteristiche degli allevamenti campionati- riproduzione*

**Table 1:** *Management system of the sampled herds - breeders*

	Numero di scrofe	Gestione a bande	Rimonta	AI/AO: sale parto	Pavimentazione Gestazione	AI/AO gestazione	Svezamento (età in gg)
1	130	no	Esterna	sì	Parzialmente grigliata	no	27-28
2	220	no	Interna	sì	Parzialmente grigliata	no	28
3	450	sì	Interna	sì	Parzialmente grigliata	no	28
4	175	no	Interna	no	Parzialmente grigliata	no	22
5	160	no	Interna	sì	Pieno	Sì	21-28

**Tabella 2:** *caratteristiche degli allevamenti campionati- magronaggio e ingrasso*  
**Table 2:** *management system of the sampled herds - growers and finishers*

	Suini da altri fornitori	Magronaggio distinto	Ingrasso separato	AI/AO ingrasso	Pavimentazione Ingrasso	Impiego pellet	Fonte alimento
1	no	no	Si	No	Parzialmente grigliato	Si	Esterna
2	sì	sì	sì	no	Grigliato	Si	Interna
3	sì	no	sì	sì	Parzialmente grigliato	No	Interna
4	no	sì	sì	no	Parzialmente grigliato	No	Esterna
5	no	sì	sì	sì	Parzialmente grigliato	No	Esterna

**Tabella 3:** *caratteristiche degli allevamenti campionati: trasporto e macellazione*  
**Table 3:** *Management system of the sampled herds - transport, lairage and slaughter*

	Tempo medio per trasporto (minuti)	Uso di mezzo proprio	Procedure di disinfezione mezzo	Permanenza in stalle di sosta in media (ore)	Numero suini macellati/ settimana in media	Macellazione di altre specie	Rivendita aziendale
1	20-25	sì	sì	48	300	Si (bovini, ovini)	sì
2	20-40	sì	sì	48	100	Si (bovini, equini, ovini)	no
3	30-60	sì	sì	24-48	200-300	Si (bovini, ovini)	sì
4	20	sì	sì	24	150	no	sì
5	120	no		24	38	no	no

*Campionamento:*

Per determinare il numero di campioni si è tenuto conto della prevalenza attesa nelle singole fasi, desunta da indagini EFSA o dalla bibliografia, con intervallo di confidenza del 95% ed un livello di errore del 10%. Per i riproduttori, la prevalenza attesa considerata è stata del 2% (Magistrali, 2009), per l'ingrasso e le carcasse del 5% (EFSA, 2009), per i linfonodi del 16% (EFSA, 2009), per il contenuto intestinale del 28% (Magistrali, 2005) e, infine, per la carne del 3% (EFSA, 2009).

In ciascun allevamento sono stati eseguiti i seguenti prelievi: feci dal reparto riproduzione (scrofe in sala parto e in gestazione, n=23) e dall'ingrasso a circa 1 mese dalla macellazione (n=27). Le feci, circa 25 grammi, sono state prelevate individualmente, conservate a temperatura di refrigerazione e conferite per l'analisi entro 4 ore dal prelievo. Sono stati quindi effettuati prelievi dai camion destinati al trasporto dopo pulizia e disinfezione, dalle stalle di sosta, sempre prima che fossero introdotti gli animali, e dalle strutture del macello. Gli animali da cui sono stati effettuati i prelievi al macello appartenevano agli stessi gruppi campionati all'ingrasso.

Per i prelievi ambientali sono state utilizzate spugne pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Sponge bags, Solar Biologicals Inc) (almeno 5 prelievi da diversi punti per ciascun ambiente). Anche questi campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di analisi.

Dai suini al macello sono stati campionati i linfonodi ileociecali (n=25), il contenuto intestinale (n=30) e le carcasse (n=18). Le carcasse sono state campionate tramite l'impiego di spugnette pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Sponge bags, Solar Biologicals Inc). Infine, sono stati prelevati 9 campioni di carnetta (carne fresca da destinare alla lavorazione degli insaccati). Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti entro 4 ore circa dal prelievo al laboratorio di analisi.

Nell'allevamento 1 sono state effettuate due serie complete di campioni; nell'allevamento 3, dove erano presenti tre strutture destinate all'ingrasso, il prelievo relativo a questa fase è stato svolto in tutti e tre i capannoni.

#### *Esami colturali:*

Per la metodica semiquantitativa, si è seguita la procedura proposta da Wales et al. (2006): in breve, sono state pesati 10 g di feci e a queste sono stati aggiunti 90 ml di acqua peptonata tamponata. Questa prima diluizione, è stata usata come diluizione 0, e successivamente sono state effettuate altre 7 diluizioni, in base 10, aggiungendo 1 ml della diluizione precedente a 9 ml di acqua peptonata. Tutte le diluizioni, da 0 a -7, sono state successivamente incubate a  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $18 \pm 3$  h. Dopo l'incubazione, 0,1 ml delle diluizioni 0, -1 e -2, sono state seminate su Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (Biokar Diagnostics), addizionato con novobiocina allo 0.01%, e incubate a  $41,5^{\circ}\text{C}$  per 24-48 ore, mentre le diluizioni dalla -3 alla -7 sono state mantenute a  $+4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Crescite opache lontano dal sito di inoculo su MSR/V sono state considerate sospette e di conseguenza seminate su terreni solidi selettivi, Xylose Lysine Deoxycolate agar (Biolife) e Chromogenic *Salmonella* Agar (Bio-Rad), e incubate a  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 - 48 ore. Le colonie sospette sono state quindi confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, Biomerieux) e sierologicamente (*Salmonella* test sera omnivalent/polyvalent, Siemens).

Se un campione risultava positivo per una delle tre diluizioni (0, -1, -2), venivano esaminate tutte le diluizioni effettuate, fino alla -7, seminando l'acqua peptonata mantenuta a refrigerazione su MSR/V, come sopra descritto.

L'interpretazione dei risultati semiquantitativi è stata effettuata sulla base di quanto descritto da Wales (2006); in breve, veniva valutata la diluizione maggiore in grado di dare luogo a crescita, e a questa aggiunto 1; questo valore numerico veniva designato 'QS score'. Il calcolo delle UFC/g<sup>-1</sup> era quindi calcolato come intervallo tra due concentrazioni, in base a quanto segue:

$$\text{Quantità di } \textit{Salmonella} \text{ (UFC/g}^{-1}\text{)} = 10^{(\text{QS}_{\text{score}} - 2)} - 10^{(\text{QS}_{\text{score}} - 1)}$$

#### *Caratterizzazione sierologica e antibiogramma:*

Almeno un isolato da ciascuna diluizione positiva è stato tipizzato sierologicamente

sulla base dello schema di Kauffmann – White (Popoff, 2003). Il saggio di sensibilità agli antimicrobici è stato eseguito sugli isolati di *Salmonella* (variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (S. 4,(5),12:i:-) ed è stato effettuato con la tecnica della diffusione in agar secondo le linee guida CSLI (2002, 2007) , utilizzando dischetti antimicrobici del commercio (OXOID). Sono stati saggiati 16 antibiotici alle seguenti concentrazioni: Ampicillina (A) 10, Cloramfenicolo (C) 30, Streptomina (S) 10, Sulfonamidi (Su) 300, Tetraciclina (T) 30, Acido nalidixico (Nal) 30, Cefotaxime (Ctx) 30, Ciprofloxacina (Cip) 5, Gentamicina (Gm) 10, Kanamicina (Kan) 30, Amoxicillina-acido clavulanico (Amc) 30, Trimethoprim-Sulfametossazolo (Sxt) 1.25/23.75, Cefalotina (Kf) 30, Colistina (Cl) 10, Enrofloxacin (Enr) 5 e Ceftazidime (CAZ) 30.

#### *Pulsed field gel electrophoresis (PFGE):*

Gli isolati provenienti da una stessa azienda e appartenenti da un medesimo sierotipo, vale a dire i ceppi di *Salmonella* 4; [5], 12:i-, sono stati caratterizzati mediante Pulsed field gel electrophoresis, sulla base del protocollo Pulse-Net-Europe, come altrove descritto (Peters, 2003) . Sono stati caratterizzati con questa metodica un isolato proveniente dall'ingrasso e uno dal contenuto intestinale al macello provenienti dai suini dell'allevamento 3, e 10 isolati provenienti da suini dell'allevamento 5, di cui due dall'ingrasso, tre dai linfonodi e cinque dal prodotto finito. In breve, i ceppi di *Salmonella* sono stati coltivati su piastre di Tryptic Soy Agar (TSA) *overnight* a 37°C, quindi sono stati risospesi in 1 ml di cell suspension buffer (CSB: 100mM TRIS, 100mM EDTA, pH 8) e portati ad una densità ottica di 0,5-0,6 a 600nm. Proteinasi K (8 U) (Invitrogen, 20mg/ml, 400 U) e 500 µl of agarosio (Certified Megabase Agarose, BIO-RAD) disciolti in tampone TE al 2% (TRIS 10mM, EDTA 1.0mM, pH 8.0) e raffreddati a 55°C, sono stati quindi aggiunti a 500 µl della sospensione batterica. La mix è stata successivamente distribuita in Plug molds (BIO-RAD) e raffreddata.

Questi blocchetti di agar sono stati quindi sottoposti a lisi in tampone Clysis B (TRIS 50mM, EDTA 50mM, Sarkosyl 1%, pH 8), addizionati con 3U di Proteinasi K, e incubati per due ore a 55°C in bagnomaria con agitazione continua. Dopo la lisi, i campioni sono stati lavati (10' a 55°C in agitazione continua) due volte con 5 ml di acqua distillata e tre volte impiegando 5 ml di tampone TE. La restrizione del DNA batterico è stata eseguita impiegando enzima XbaI (Promega)(50 U, a 37°C per 18 ore); solo per *Salmonella* Hadar, è stata condotta una seconda digestione impiegando l'enzima BlnI (Amersham Biosciences), come sopra descritto.

L'elettroforesi è stata effettuata con il sistema Chef Mapper XA (BIO-RAD), in gel di agarosio al 1% e in tampone TBE 0,5X (TRIS 50mM, Acido borico 50mM, EDTA 0.5mM) per 22 ore a 14°C, 6V/cm, switch time da 2s a 64s e angolo 120°. Come riferimento sono stati utilizzati ceppi di *Salmonella* Braenderup H9812 e *Salmonella* Senftenberg. Dopo la corsa, il gel è stato colorato con Bromuro di Etidio (0.4 µg/ml) per 10', lavato in acqua distillata per 30' e fotografato con un transilluminatore a UV. Le immagini ottenute sono state successivamente elaborate utilizzando il programma BIONUMERICS (v. 4.61, Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgio).

## **RISULTATI**

In tabella 4 vengono indicati i risultati relativi agli esami batteriologici selettivi per *Salmonella*, distinti sulla base del punto di origine lungo la filiera. I risultati sono espressi come numero di positivi sul totale dei campioni esaminati; viene inoltre indicato il sierotipo di appartenenza. In un caso, vale a dire in un campione di contenuto intestinale proveniente dall'allevamento numero 3, sono stati isolati due diversi sierotipi di *Salmonella* (variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (S. 4,(5),12:i:-) e *Salmonella* 0:50).

**Tabella 4:** esiti degli esami batteriologici (numero di campioni positivi/ campioni prelevati) e sierotipo di *Salmonella*

**Table 4:** results of bacteriological tests (number of positives/ tested samples) and serotypes of *Salmonella*

	Produzione primaria (pre-harvest)		Trasporto, stalle di sosta e mattatoio (harvest)			Macellazione e lavorazione del prodotto (post-harvest)			
	Scrofe	Ingrasso	Trasporto	Stalle di sosta	Mattatoio	Linfonodi	Intestino	Carcasse	Carne fresca
1	1/46 S. Derby	0/54	0/10	0/10	0/10	0/48	0/48	0/36	0/25
2	0/23	0/27	0/5	1/5 S. Rissen	0/5	0/24	0/24	0/18	0/9
3	3/25 S. Derby	0/78	0/5	0/5	0/5	0/24	0/24	0/24	0/9
4	0/23	1/27 S. 4; [5], 12:i-	0/5	0/5	0/5	0/24	3/24 S. 4; [5], 12:i-; S. 0:50	0/24	0/25
5	0/23	1/27 S. 4; [5], 12:i-	0/5	0/5	0/5	3/24 S. 4; [5], 12:i-	0/30	0/24	1/1 S. 4; [5], 12:i-
Totale	4/140 (2,8%)	2/213 (0,9%)	0/30	1/30	0/30	3/144 (2,1%)	3/150 (2,0%)	0/116	1/69 (1,4%)

In Tabella 5 sono indicati i sierotipi di *Salmonella* isolati lungo la filiera nei cinque allevamenti campionati; sono inoltre riportati i valori di concentrazione riscontrati, ottenuti mediante metodica semi-quantitativa.

**Tabella 5:** esiti delle tipizzazioni e rilevazioni semiquantitative nei campioni positivi

**Table 5:** serotypes and semi-quantitative determination in positive samples

Allevamento	Sierotipo	Origine	Identificativo Campioni	Concentrazione (in UFC/g)
1	<i>Derby</i>	Scrofe (gestazione)	21	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>
2	<i>Rissen</i>	Stalle di sosta	9	1-10
3	<i>Derby</i>	Scrofe (gestazione)	16 19,22	1-10; 10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>
4	4; [5], 12:i- 0:50	Ingrasso	8	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>
		Intestino	15	10-10 <sup>2</sup>
5	4; [5], 12:i- 4; [5], 12:i- 4; [5], 12:i-	Intestino	24 15,29	10-10 <sup>2</sup> 10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>
		Ingrasso	11	10-10 <sup>2</sup>
		Linfonodi	1,2,21	1-10
		Carne	1	10-10 <sup>2</sup>

Per quanto riguarda la sensibilità agli antimicrobici, tutti gli stipti saggiati di variante monofasica di *Salmonella* Typhimuirum (S. 4,(5),12:i:-) hanno mostrato resistenza a ampicillina, streptomina, sulfonamidi e tetracicline; questo profilo di resistenza è conosciuto come resistotipo ASSuT.

L'analisi in PFGE ha permesso di evidenziare una percentuale di omologia dei ceppi superiore al 99%; gli isolati di *Salmonella* variante monofasica di *Salmonella* Typhimuirum (S. 4,(5),12:i:-) possono quindi essere considerati identici.

## DISCUSSIONE

In tutte e cinque le aziende sottoposte a campionamento è stata osservata almeno una positività per *Salmonella*, in allevamento, durante la fase di trasporto, durante la macellazione o nella carne fresca, a conferma di come l'infezione da *Salmonella* sia ampiamente diffusa nelle filiere suinicole italiane (EFSA, 2008; Merialdi, 2008).

Per quanto riguarda i sierotipi isolati, S. Derby, S. Rissen, e S. 4; [5], 12:i-, identificati nelle aziende oggetto di campionamento, sono tra i cinque isolati più frequenti nei suini italiani, in base a quanto emerso da un'indagine EFSA (2008). Nel corso di questo lavoro, S. Derby è stata isolata nel settore riproduttori, ed in particolare nelle scrofe in gestazione: questo dato non deve stupire: si tratta infatti del sierotipo prevalente nei riproduttori suini di tutta Europa (EFSA, 2009). Il sierotipo S. 4; [5], 12:i-, è stato invece riscontrato in due aziende, prima a livello di ingrasso e successivamente nel contenuto intestinale (allevamento 4), e nei linfonodi e nella carne fresca (allevamento 5), e tutti gli isolati si sono dimostrati appartenenti al medesimo pulso tipo in PFGE e al resistotipo ASSuT. Questo resistotipo, è stato segnalato negli ultimi dieci anni in Europa sia in casi di infezione da *Salmonella* spp. nell'uomo di origine alimentare, sia nei suini e nella carne suina (Hopkins, 2010) ed è considerato una variante di S. Typhimurium di particolare interesse da un punto di vista di sanità pubblica. Il pulsotipo evidenziato è inoltre simile al clone STMYXB079, in aumento recentemente tra le monofasiche (Dionisi, comunicazione personale).

Nonostante il rilievo di *Salmonella* in tutte le filiere campionate, i risultati ottenuti in termini di percentuali di positività sono sostanzialmente contenuti e non rispecchiano i livelli di prevalenza riscontrati in corso di indagini su larga scala condotte in Italia (DATI EFSA). Ad esempio, non sono state riscontrate carcasse positive per *Salmonella*, laddove il dato ufficiale europeo del 2008 (EFSA) riporta una media del 8,3%. Osservando poi i dati relativi all'isolamento di *Salmonella* nei linfonodi sono risultati positivi 3 linfonodi su 144, pari al 2% circa, percentuale molto lontana dal 16,5% rilevato dall'EFSA nel 2008 in Italia. Questi dati di prevalenza erano peraltro stati presi in considerazione per determinare la numerosità campionaria della presente indagine. Dal momento che i riscontri di positività si sono attestati su valori inferiori all'atteso, questo ha limitato le possibilità di effettuare valutazioni a posteriori sull'origine dei ceppi, basate sulla caratterizzazione sierologica o molecolare degli stessi.

Nonostante la presenza di *Salmonella* Rissen in uno dei mezzi di trasporto, non è stato possibile dimostrare casi di infezione durante il trasporto, o nelle stalle di sosta, come avvenuto in altri contesti (Magistrali, 2008). Questo rilievo può essere ricondotto ad alcune caratteristiche strutturali delle aziende soggette a campionamento: per questo lavoro sono state infatti selezionate aziende di dimensione limitata: in quattro allevamenti campionati venivano utilizzati camion aziendali per il trasporto, per i quali erano previste procedure di disinfezione. Negli stessi allevamenti il trasporto avveniva in tempi brevi, al di sotto delle 2 ore: questo potrebbe avere ridotto lo stress collegato e quindi la riattivazione di infezioni latenti. Anche le stalle di sosta hanno rivelato basse percentuali di contaminazione, legati probabilmente al limitato numero di animali macellati: infatti, solo in un caso *Salmonella* Rissen è stata individuata in un campione di questa origine. L'assenza di infezioni crociate

durante il trasporto e il periodo trascorso nelle stalle di sosta può rendere ragione del numero basso di linfonodi e contenuti intestinali riscontrati positivi, rispetto alla media nazionale rilevata dall'EFSA (2008). Questa considerazione appare avvalorata da un recente lavoro, dove si dimostra come isolamento di *Salmonella* nelle stalle di sosta sia in grado di aumentare di 13.5 volte e di 4 volte la probabilità di un riscontro positivo a livello di carcasse ed a livello di linfonodi rispettivamente ( De Busser, 2011). D'altra parte, è stato più volte dimostrato come la presenza di contaminazioni e cross contaminazioni nelle ultime fasi della filiera, durante il trasporto, nelle stalle di sosta e al macello siano di particolare importanza nel determinare la contaminazione finale delle carcasse (Hurd, 2001; De Busser, 2011).

Le valutazioni in sistema semi-quantitativo, vedono livelli di escrezione fecale variabili da 1-10 ufc/g a 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ufc/g; quest'ultimo valore è stato registrato in due scrofe in gestazione, in assenza di sintomatologia clinica indicativa di salmonellosi, e può essere giustificato con un'infezione recente (Baggesen, 1999). In generale, gli animali positivi hanno mostrato livelli di escrezione fecale tra 1 e 10<sup>3</sup>: questi valori sono compatibili con quanto descritto in letteratura ( Hurd, 2001, Jensen, 2006; Baggesen, 1999). Infatti, nonostante siano disponibili pochi dati in merito alla entità delle escrezioni fecali di *Salmonella* in suini infettati naturalmente, è stato stimato un livello di circa 100 ufc/g, ad eccezione di casi di salmonellosi clinica o in prossimità del momento di infezione (EFSA, 2010), durante i quali tali valori tendono ad essere più elevati. I nostri risultati, con ridotti valori di contaminazione nei contenuti intestinali al macello, sembrerebbero confermare la scarsa incidenza di infezioni recenti nelle fasi finali della filiera.

## CONCLUSIONI

I risultati hanno mostrato una bassa percentuale di infezione da *Salmonella* spp. nelle fasi terminali della filiera in suini provenienti da allevamenti di piccole-medie dimensioni. Alcuni fattori possono essere presi in considerazione per giustificare il dato ottenuto in queste realtà produttive, che potrebbero essere legati ad un numero contenuto di infezioni nelle fasi terminali della filiera, come l'impiego di mezzi di trasporto propri, l'invio a macelli a breve distanza dall'allevamento e di piccole dimensioni. Come sopra indicato, queste osservazioni necessitano di essere confermate da indagini mirate, che tengano conto di valori di prevalenza attesi inferiori a quelli riportati in bibliografia.

## BIBLIOGRAFIA

Anonymous. EN ISO 6579:2002/A1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (ISO 6579/2002/Amd 1:2007). July 2007

Baggesen D.L. Wingstrand A., Carstensen B., Nielsen B., Aerestrup F.M. (1999). Effects of the antimicrobial growth promoter tylosin on subclinical infection of pigs with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. AJVR 60: 1201-1206.

CLSI (ex NCCLS). January 2007, M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement.

CLSI (ex NCCLS), 2002. M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard.

EFSA (2008): Report of the task force on zoonosis data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigS. Part A. The EFSA Journal, 135: 1-111.

EFSA (2009): Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part A. *Salmonella* prevalence estimate. EFSA Journal 2009; 7(12).

EFSA Panel on Biological Hazards; Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pig. EFSA Journal 2010; 8(4):1547.

De Busser E.V., Maes D., Houf K., Dewulf J., Imberechts H., Bertrand S., De Zutter L. (2011) Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. International Journal of Food Microbiology.

Hopkins K.L., Kirchner m., Gueraa B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., jakubczack A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010) Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, (5), 12:i- in Europe: a new pandemic strain? Eurosurveillance 15 (22). Available online: <http://www.eurosurveillance.org>.

Hurd H.S., Gailey J.K., McKean J.D., Rostagno M.H. (2001) Rapid infection in market-weight swine following exposure to *Salmonella* Typhimurium- contaminated environment. AJVR 62: 1194-1197.

Magistrali C., Dionisi A.M., de Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) Contamination of *Salmonella* in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. Research in Veterinary Science, 85: 204-207.

Magistrali C., D'Avino N., Ciuti F., Cucco L., Maresca C., Paniccià M., Scoccia E., Tentellini M., Pezzotti G. (2009) Reproductive cycle, number of parities and faecal *Salmonella* spp. excretion in sows: a longitudinal study. Proceedings of 8th International Symposium on Epidemiology and Control of foodborne pathogens in pork: 75-78.

Magistrali C., de Curtis P., Paniccià M., Cucco L., Pezzotti G., Fogliani A. (2005). An epidemiological survey on the prevalence of *Salmonella* in swine in Central Italy. Proceedings of 6th International Symposium on Epidemiology and Control of foodborne pathogens in pork: 243-245.

Meriardi G., Barigazzi G., Bonilauri P., Tittarelli C., Bonci M., d'Incau M., Dottori M. (2008). Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow to finish swine herds. Zoonoses Public Health 55: 222-226.

Popoff M.Y., Bockenmuhl J., Gheesling L.L. (2003) supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann- White Scheme. Research in Microbiology 154, 173-174.

Schmidt P.L., O'Connor A.M., McKean J.D., Hurs H.S. (2004) The association between cleaning and disinfection of lairage pens and the prevalence of *Salmonella enterica* in swine at harvest. Journal of Food Protection 67: 1384-1388.

Wales A., Breslin M., Davies R. (2006). Semiquantitative assessment of the distribution of *Salmonella* in the environment of caged layer flocks. Journal of Applied microbiology 10: 309-318.

**PERSISTENZA DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO  
RESISTENTI NEGLI AMBIENTI DI ALLEVAMENTO DOPO  
PULIZIA E SANIFICAZIONE E SULLE CARCASSE SUINE A FINE  
MACELLAZIONE**

***PERSISTENCE OF METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS IN PIG HOLDINGS AFTER CLEANING AND  
SANITIZATION AND ON PIG CARCASSES AT THE END OF THE  
SLAUGHTERING PROCESS***

GALLETTI E.<sup>1</sup>, MERIALDI G.<sup>1</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>1</sup>, MAZZARO A.<sup>1</sup>, ALBORALI  
G.<sup>1</sup>, GRASSI A.<sup>1</sup>, ZANONI MG., GRANITO G.<sup>2</sup>, GUERZONI S.<sup>2</sup>, ARIOLI E.<sup>2</sup>,  
ZAVATTINI S.<sup>2</sup>, FRANCO A.<sup>3</sup>, BONILAURI P.<sup>1</sup>, MARTELLI P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

<sup>2</sup> Veterinari liberi professionisti

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

<sup>4</sup> Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma

**Parole chiave:** MRSA, suini, antibiotico resistenza, zoonosi

**Key words:** MRSA, pigs, antimicrobial resistance, zoonoses

**Riassunto.** Questo lavoro si è prefisso due scopi: 1) valutare la persistenza di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) negli ambienti di allevamenti suini naturalmente contaminati dopo l'applicazione delle operazioni di pulizia e sanificazione; 2) valutare la persistenza della contaminazione da MRSA sulle carcasse di suini, provenienti da allevamenti positivi, alla fine del processo di macellazione. Sei allevamenti già identificati come positivi per MRSA sono stati inclusi nello studio. Da ciascun allevamento sono stati raccolti campioni ambientali dalle sale parto, svezzamento, messa a terra e ingrasso prima (in presenza di suini, alla fine della fase) e dopo le procedure di pulizia e disinfezione (prima dell'introduzione dei suini). Per la valutazione della presenza di MRSA sulle carcasse suine alla fine della macellazione sono state studiate tre partite di suini provenienti da altrettanti allevamenti dei sei precedenti. Da ciascuna partita 60 tamponi nasali sono stati raccolti dopo iugulazione e 20 tamponi (sodibox®) sono stati attenti dallo strofinamento della cute della gola alla fine della catena di macellazione. I risultati ottenuti confermano l'elevata contaminazione ambientale da parte di MRSA negli allevamenti studiati. Le operazioni di sanificazione non si sono dimostrate sempre idonee ad eliminare completamente la contaminazione ambientale, tuttavia, in tutte le fasi di produzione, è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra gli ambienti prima e dopo le operazioni di lavaggio e disinfezione. Tale differenza è apparsa molto più evidente nelle sale parto. Lo studio condotto al macello ha fornito evidenza della contaminazione da MRSA delle carcasse provenienti da allevamenti naturalmente colonizzati.

**Abstract.** This study was conducted to evaluate: 1) the persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) after cleaning and sanitization operations in the environment of pig herds previously known to be colonized; 2) the presence of MRSA on pig carcasses at the end of the slaughter process. Six herds colonized by MRSA were enrolled. From each herd, environmental samples were collected from farrowing, weaning, growing and finishing units. Ten dust samples for each unit were taken by using sterile dry swabs (Sodibox®) before (in the presence of pigs, at the end of the phase) and after cleaning and sanitization procedures (before

pigs introduction) and cultured for MRSA. The evaluation of the presence of MRSA on pig carcasses at the end of the slaughtering chain was conducted on three batches from different herds. From each batch 60 nasal swabs were collected immediately after jugulation and twenty samples were gathered using sterile dry swabs (Sodibox®) from the skin of the throat region at the end of the slaughter line, just before cutting or chilling. In populated farrowing crates 5 of 6 herds were contaminated (percentage of positive dust samples ranging from 30% to 100%). Only one herd showed residual MRSA contamination in farrowing crates after cleaning and sanitization (1 positive out of 10). Environmental contamination in populated weaning units was recorded in 5 out of 6 holdings (range 20%-100%); 3 holdings resulted contaminated after cleaning and sanitization (range 30%-100%). In growing units all herds were contaminated while populated (range 20%-90%) and 5 after cleaning and sanitization (20%-70%). Populated finishing barns resulted contaminated in all holdings (range 10-90%). The environmental contamination persisted after cleaning in 4 out of 6 (range 10%-20%). The overall proportion of positive samples in populated units and after cleaning and sanitization were 50 and 19%, respectively.

The study suggests that, although current cleaning and sanitization procedures are likely to be inadequate to completely eliminate MRSA environmental contamination, the more these operations are strict (as in farrowing crates) the more a significant reduction can be achieved.

## **INTRODUZIONE**

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) è un batterio Gram-positivo considerato come resistente a tutti gli antibiotici beta-lattamici. I ceppi di MRSA sono emersi a livello ospedaliero negli anni '70. Dagli anni '90 è stato osservato un sostanziale cambiamento nell'epidemiologia di MRSA, con la diffusione di ceppi multiresistenti anche in soggetti non ospedalizzati, definiti come Community-acquired MRSA (CA-MRSA).

La prima segnalazione di colonizzazione nei suini con implicazione nelle infezioni umane è stata riportata da Voss et al., (2005) nei Paesi Bassi; successivamente, vi sono state segnalazioni anche in Francia, Danimarca, Germania e Singapore (Guardabassi et al., 2007; de Neeling et al., 2007; Sergio et al., 2007) e il contatto con i suini è stato identificato come importante fattore di rischio per la colonizzazione di MRSA nell'uomo (Rijen et al., 2007). Studi recenti hanno inoltre documentato la trasmissione di MRSA tra suini e operatori del settore suinicolo come veterinari, operai e loro famiglie (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006; Pan et al., 2009). In Italia, in un recente studio, nel 38% delle partite di suini macellati è stata evidenziata colonizzazione nasale da MRSA con notevole eterogeneità dei cloni isolati (Battisti et al., 2010).

Il potenziale ruolo dei prodotti alimentari nella diffusione di MRSA di origine animale è tuttora sconosciuto; alcuni lavori hanno comunque messo in evidenza la presenza di MRSA nella catena alimentare (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007). Secondo il parere dell'EFSA, pur essendo basso il rischio di infezione per l'uomo tramite il cibo, assumere o maneggiare cibi contaminati può rappresentare veicolo di trasmissione di MRSA (The EFSA Journal, 2009). Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la persistenza di MRSA in allevamenti suini della Lombardia e dell'Emilia Romagna, valutando nello specifico la contaminazione ambientale nelle diverse fasi dell'allevamento prima e dopo pulizia e disinfezione e la presenza sulle carcasse dei suini al termine della catena di macellazione.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Studio in allevamento:***

Gli allevamenti sono stati arruolati in base ad un'analisi preliminare che aveva evidenziato la colonizzazione di tali allevamenti per MRSA. In totale sono stati considerati 6 allevamenti, due

della provincia di Modena, 2 della provincia di Mantova, 1 della provincia di Verona e 1 della provincia di Brescia.

#### Allevamento 1:

Allevamento di 1000 scrofe, dislocato in tre siti. Tutto pieno/tutto vuoto eseguito in ogni fase. Le fasi di sanificazione possono essere così riassunte: rimozioni parti asportabili (ove presenti), asportazione della componente organica, distribuzione del detergente schiumogeno e lavaggio con idropulitrice ad alta pressione. Ad ambiente asciutto segue quindi la distribuzione del disinfettante a base di aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio. Il vuoto sanitario è fissato in 7 giorni per ogni ambiente. Le sale parto e gli svezzamenti sono lavati a caldo, mentre la fase di ingrasso è lavata a freddo.

#### Allevamento 2:

Allevamento di 900 scrofe, dislocato in tre siti. Viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto e svezzamento (48 ore di vuoto sanitario). Nella fase di magronaggio-ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore (5 gg di vuoto sanitario). La sanificazione nelle sale parto si attua mediante lavaggio a freddo a bassa pressione seguito dalla distribuzione di detergente alcalino schiumogeno; dopo 30 minuti si procede con lavaggio ad alta pressione a caldo, risciacquo con acqua fredda, asciugatura e disinfezione con un prodotto a base di alchilammine. Negli svezzamenti il protocollo prevede la fase di lavaggio ad alta pressione a freddo e non a caldo, per il resto la procedura è simile a quella utilizzata nelle sale-parto. Nell'ingrasso viene utilizzata l'acqua fredda ad alta pressione, a cui segue, dopo opportuna asciugatura, la disinfezione con un prodotto a base di alchilammine.

#### Allevamento 3:

Allevamento di 2000 scrofe, dislocato in due siti. Viene effettuato il tutto pieno-tutto vuoto in tutti i settori (vuoto sanitario variabile da 1 a 3 giorni). Le procedure di sanificazione nelle sale parto prevedono: lavaggio a bassa pressione degli ambienti, l'applicazione del detergente schiumogeno, l'attesa di 10 minuti, il lavaggio ad alta pressione a freddo, la disinfezione con prodotto a base di glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio e l'applicazione di calce idrata. Negli svezzamenti, magronaggi e ingrassi, a differenza del protocollo in uso per le sale-parto, non è prevista la fase di detersione con schiumogeno. Inoltre, la calce idrata non viene utilizzata negli svezzamenti e nei magronaggi ma solo nelle strutture per l'ingrasso.

#### Allevamento 4:

Allevamento di 1000 scrofe, in sito unico. Nell'allevamento viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto e svezzamento. Nella fase di messa a terra il flusso è continuo, mentre nell'ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore. I protocolli di pulizia e disinfezione prevedono un lavaggio con vapore a caldo, l'uso di un detergente schiumogeno alcalino e di un disinfettante a base di alchilammine e sali quaternari di ammonio ed EDTA.

#### Allevamento 5:

Allevamento di 1500 scrofe, dislocato in due siti. Nell'allevamento viene effettuato il tutto pieno e tutto vuoto nelle sale parto, svezzamento e messa a terra. Nella fase di dell'ingrasso il tutto pieno e tutto vuoto avviene per settore. I protocolli di pulizia e disinfezione prevedono un lavaggio con vapore a caldo, l'uso di un detergente schiumogeno alcalino e di un disinfettante a base di aldeide glutarica e sali quaternari di ammonio.

#### Allevamento 6:

Allevamento di circa 1550 scrofe dislocato in due siti. Tutto pieno/tutto vuoto eseguito in ogni fase. Nella sala parto viene distribuito un prodotto alcalino schiumogeno direttamente a contatto con strutture e sostanza organica. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKON S®).

Nelle gabbiette di svezzamento, nella messa a terra ed ingrasso, dopo l'allontanamento dei suini, la sala viene bagnata con acqua di riciclaggio per 24 ore. Segue lavaggio con idropulitrice (a caldo) dispersione di un disinfettante multicomposto (VIRKON S®).

All'interno di ciascun allevamento sono stati prelevati campioni da: sale parto, gabbie svezzamento, locali di messa a terra, locali di ingrasso. Le condizioni di prelievo scelte sono state; 1) presenza di animali al termine di ciascuna fase, 2) dopo pulizia e disinfezione in assenza di animali. I prelievi sono stati effettuati strofinando 10 garze sterili (Sodibox®) su superfici ambientali.

### **Studio al macello**

La valutazione sulla presenza di MRSA sulle carcasse a fine macellazione è stata eseguita su 3 partite provenienti da 3 dei sei allevamenti predenti ed, in particolare, da 1 allevamento della provincia di Modena e dai due di Mantova. Da ogni partita sessanta tamponi nasali sono stati prelevati da suini immediatamente dopo la iugulazione al fine di confermare la colonizzazione da MRSA. Alla fine della catena di macellazione, appena prima del sezionamento a caldo, garze sterili (Sodibox®) sono state strofinate sulla cute della regione della gola per valutare la contaminazione delle carcasse.

### **Procedure di laboratorio**

I tamponi nasali prelevati al macello sono stati raggruppati in 6 pool da 10 per ogni partita. Tutti gli altri campioni sono stati testati singolarmente.

Dopo una fase di pre-arricchimento del campione in Mueller-Hinton contenente 7,5% di NaCl, ed incubazione a 37°C per 24 ore, è stato eseguito un arricchimento in brodi selettivi costituiti da Phenol Red Mannitol Broth e Tryptone Soya Broth addizionati con 5 mg/L di oxacillina e 44 mg/L di aztreonam. Dopo incubazione a 37°C per 16-20 ore i brodi di arricchimento selettivo sono stati seminati su due terreni selettivi: Brilliance MRSA (Oxoid,UK) e Oxacillin Resistance Screen Agar (Oxoid,UK) e incubati a 37°C per 48 ore.

Le colonie sospette sono state quindi identificate come *S. aureus* tramite tecniche standard: morfologia della colonia, colorazione di Gram, test della catalasi e della coagulasi.

L'identificazione della specie tramite l'amplificazione del gene *nuc* e del gene codificante per la resistenza ai beta-lattamici *mecA* è stata inoltre effettuata tramite PCR secondo le metodiche descritte da Brakstad et al., (1992) e da Strommenger et al., (2003).

Tutti i ceppi isolati sono in corso di genotipizzazione.

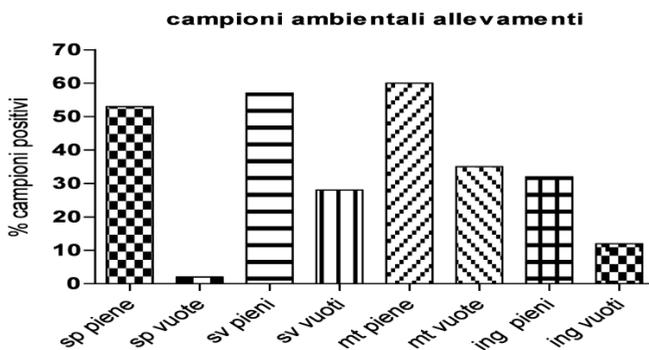
### **Analisi Statistica**

Le differenze fra le proporzioni di campioni risultati positivi per la presenza di *S. aureus* meticillino resistenti (MRSA) sia globalmente che nei differenti compartimenti degli allevamenti (sale parto, gabbie svezzamento, locali di messa a terra e di ingrasso) nelle due condizioni di prelievo (presenza di animali, indicate come piene e dopo pulizia e disinfezione indicate come vuote) sono state valutate tramite test  $\chi^2$  ( $p < 0.01$ ). La probabilità di trovare un campione positivo nelle differenti condizioni di prelievo sia globalmente che per i differenti compartimenti degli allevamenti è stata misurata tramite calcolo dell'Odds ratio.

## **RISULTATI**

Nelle sale parto in presenza di animali, gli allevamenti positivi sono risultati 5 con una percentuale di positività dei campioni all'interno di ciascun allevamento compresa fra 30% e 100%. I campioni ambientali raccolti dalle sale parto pulite e disinfettate hanno evidenziato la presenza di MRSA solo nell'allevamento 2 con una percentuale di campioni positivi pari al 10%. Cinque allevamenti hanno evidenziato MRSA nelle gabbie di svezzamento piene con percentuali di positività dal 20% (allevamento 5) al 100% (allevamento 2). Nella fase di svezzamento, 3 allevamenti su 6 hanno mostrato presenza di MRSA nelle gabbie pulite con percentuali di campioni positivi del 30% (allevamento 3), 40% (allevamento 6) e 100% (allevamento 2). Nella fase di messa a terra tutti gli allevamenti sono risultati positivi nei locali sporchi, con positività dal 20% al 90%. In

questa fase un solo allevamento è risultato negativo per MRSA nel campionamento dei locali puliti, nei restanti allevamenti le percentuali di positività variano dal 20% al 70%. Nell'ultima fase presa in considerazione, quella dell'ingrasso, tutti gli allevamenti sono risultati positivi nei locali pieni con una percentuale elevata solo nell'allevamento 2 (90%), mentre gli altri allevamenti hanno evidenziato positività variabili dal 10% al 30%. Due allevamenti sono risultati negativi nei locali puliti; le percentuali di positivi a questo livello sono pari al 10% e al 20%. Nel grafico 1 vengono riportati i dati di positività considerando tutti i campioni positivi dei sei allevamenti, con la separazione tra locali pieni (sporchi) e locali vuoti (puliti).



**Grafico 1:** percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. **sp:** sala parto piena/vuota; **sv:** sala svezzamento piena/vuota; **mt:** locali messa a terra o pieni/vuoti; **ing:** locali ingrasso pieni/vuoti

**Graph 1:** percentage of positive samples of 6 herds in units with or without animals. **sp:** farrowing unit populated/empty; **sv:** weaning unit populated /empty; **mt:** growing unit populated /empty; **ing:** finishing units populated /empty

Globalmente la percentuale di campioni positivi è pari al 50,4% ed al 19%, rispettivamente prima e dopo le operazioni di pulizia e sanificazione. Questa differenza risulta statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), inoltre la probabilità di osservare campioni positivi per MRSA in locali in presenza di animali è risultata essere 4.29 (IC 95%: 2.87 – 6.50) volte superiore.

Il risultato più interessante si ha tuttavia dall'analisi nei vari reparti. Infatti, la probabilità di osservare un campione contaminato da MRSA in sala parto è risultata essere ben 67.43 (IC 95%: 9.89- 2789.90,  $p < 0.01$ ) volte superiore prima delle operazioni di pulizia e disinfezione. Nei restanti compartimenti questa probabilità risulta comunque significativamente maggiore, ma con odds ratio di molte unità inferiori. (tab.1)

Ambiente	Odds ratio $P_{(MRSA+)}$ piena / vuota	p
Sala Parto	67.43 (IC 95%: 9.89- 2789.90)	<0.01
gabbie svezzamento	3.31 (IC 95%: 1.45- 7.60)	<0.01
locali di messa a terra	2.78 (IC 95%: 1.25-6.25)	<0.01
locali di ingrasso	3.51 (IC 95%: 1.25-10.75)	<0.01

**Tab.1.** Odds ratio della probabilità di ottenere un campione positivo a seconda della presenza o dell'assenza degli animali e dello stato di pulizia degli ambienti.

**Tab.1:** Odds ratio of room with animal inside vs cleaned room for the probability of detection MRSA positive environmental samples.

Nelle fasi di produzioni in presenza di animali, gli allevamenti positivi sono pari a 5 nelle gabbie parto e svezzamento (percentuali di campioni positivi pari al 53% e 54% rispettivamente); nelle fasi successive tutti gli allevamenti sono positivi ma si osserva un picco della prevalenza dei Sodibox positivi nella fase di messa a terra (60%) e un decremento nella fase di ingrasso (32%).

Il numero di allevamenti positivi, dopo pulizia e disinfezione, è molto basso nelle sale parto (1 allevamento positivo su 6, con un solo sodibox positivo su 10) ed aumenta fino alla fase di messa a terra dove si raggiungono 5 allevamenti positivi su 6; nelle sale di ingrasso il numero di positivi decresce (4 su 6 allevamenti); le percentuali di campioni di positivi sono pari al 2%, 28%, 32% e 12% rispettivamente nelle quattro fasi.

Prendendo in considerazione i singoli allevamenti si è evidenziato come il solo allevamento 1 abbia sempre dato esito negativo per la ricerca di MRSA in tutte le fasi produttive dopo pulizia e disinfezione.

Per quanto riguarda i tamponi nasali raccolti dopo iugulazione, tutti i pool (6/6) sono risultati positivi nei primi due allevamenti mentre nell'allevamento 3 il 50% (3/6) dei pool è risultato positivo. I campioni eseguiti tramite strofinamento della cute alla fine della catena di macellazione hanno mostrato percentuali di positività pari al 20% (allevamento 1); 45% (allevamento 2); 40% (allevamento 3).

## DISCUSSIONE

Per la valutazione della persistenza di *S. aureus* meticillino-resistenti a livello ambientale sono stati analizzati un totale di 480 sodibox di 6 diversi allevamenti, prelevati dalle gabbie parto, svezzamento, sale di messa a terra e ingrasso. In particolare sono stati analizzati 240 sodibox alla fine delle fasi di produzione (in presenza di animali) e 240 sodibox (dopo le fasi di pulizia e disinfezione).

Considerando il totale dei campioni è stata innanzi tutto evidenziata una sostanziale differenza, statisticamente significativa, tra i locali alla fine della fase di produzione (50,4%) rispetto agli stessi locali puliti e disinfettati (19%). Le procedure di pulizia e disinfezione risultano avere quindi un ruolo favorevole in termini di abbattimento della carica batterica ambientale e questo risulta evidente soprattutto nelle sale parto. In questo reparto, infatti, la probabilità che i campioni risultino positivi in presenza di animali è di ben 67 volte superiore rispetto alle sale vuote (pulite e disinfettate).

Campionando tamponi nasali di suini di diverse età, Smith et al.(2009) hanno mostrato positività per MRSA del 100% a 9-12 settimane, ed un decremento, fino al 36%, negli animali di età superiore alle 24 settimane. Weese et al., (2010a) analizzando sempre tamponi nasali di suinetti di 1 giorno di vita fino al 70° giorno di età hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34.5% rispetto ad una prevalenza totale nel dopo svezzamento pari all'85%. I dati ottenuti nel nostro studio, pur non valutando la colonizzazione animale, mostrano come a carico dell'ambiente l'andamento della presenza di MRSA sia comparabile ai dati ottenuti nei precedenti lavori: all'aumentare dell'età degli animali (fase di ingrasso) si assiste ad una diminuzione della proporzione dei campioni ambientali risultati positivi.

L'analisi condotta al macello pur valutando animali provenienti da un numero limitato di partite, conferma che negli allevamenti colonizzati la presenza di portatori nasali al macello è frequente. Di notevole interesse appare il fatto che, a fine macellazione, il riscontro di MRSA sulle carcasse risulta assai frequente.

Diversi Autori hanno dimostrato la contaminazione di prodotti a base di carne suina da parte di cloni di MRSA (Normanno et al., 2007; Weese et al., 2010 (b); van Loo et al., 2007; de Boer et al., 2009; Pu et al., 2009); sono poche però le segnalazioni di infezioni causate dall'ingestione di cibi contaminati da MRSA (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007).

## CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato che all'interno degli allevamenti suini colonizzati, la contaminazione ambientale da parte di MRSA è elevata. Le normali procedure di pulizia e disinfezione sembrano risultare per lo più inadeguate per una completa eliminazione di MRSA dai locali in cui i suini vengono stabulati. Tuttavia, appare evidente che tali operazioni contribuiscono a limitare la colonizzazione degli ambienti. Considerando i dati globalmente, i risultati migliori sono stati ottenuti nelle sale parto. E' noto che in questi reparti le operazioni di sanificazione e di vuoto sanitario sono generalmente più accurate. Pertanto è possibile affermare che un maggior rigore negli interventi di sanificazione potrebbe contribuire a ridurre la contaminazione ambientale. Quanto l'entità della riduzione della carica di MRSA negli ambienti possa incidere su una significativa diminuzione della proporzione di animali colonizzati al momento della loro uscita dagli ambienti, resta materia ancora da accertarsi.

I nostri risultati evidenziano quindi il ruolo fondamentale della pulizia degli ambienti per abbattere la potenziale fonte di colonizzazione per gli animali, ed evidenziano anche una probabilità di campioni ambientali positivi (e quindi possibilmente di carica ambientale) correlabile alle diverse classi di età degli animali, dimostrata dalla netta diminuzione di campioni positivi tra i locali di messa a terra pieni, in presenza quindi di animali, e i locali di ingrasso pieni. Tali ipotesi devono essere tuttavia avvalorate da un'analisi che prenda in considerazione contemporaneamente la presenza di MRSA a livello ambientale e degli animali.

I risultati riguardanti la presenza di MRSA sulle carcasse alla fine della macellazione supportano l'ipotesi di una potenziale contaminazione degli alimenti di origine suina da parte di cloni di MRSA. Ulteriori studi risultano quindi necessari per valutare il potenziale ruolo delle carni nella trasmissione all'uomo di MRSA di origine animale.

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato nel contesto del Progetto di Ricerca Corrente anno 2008 "Epidemiologia dell'infezione da *Staphylococcus aureus* (MRSA) in allevamenti di suini e polli da carne" finanziato dal Ministero della Salute.

## BIBLIOGRAFIA

Brakstad O., Aasbakk K., Maeland J.A., (1992) "Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene". *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654-1660.

Battisti A., Franco A., Meriardi G., Hasman H., Iurescia M., Lorenzetti R., Feltrin F., Zini M., Aarestrup F.M. (2010). Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Veterinary Microbiology*, 2010 May 19;142(3-4):361-6

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B., (2009) 'Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat' *Int J Food Microbiol.* 134, 52-56.

de Neeling A.J., van den Broek M.J.M., Splaburg E.C., van Santen-Verheuevel M.G., Dam-Deisz W.D.C., Boshuizen H.C., van de Giessen A.W., van Duijkeren E., Huijsdens X.W. (2007) "High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122,366-372.

Guardabassi L., Stegger M., Skov R., (2007) "Retrospective detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *Vet Microbiol.* 122,384-386.

Huijsdens X.W., van Dijke B.J., Spalburg E., van Santen-Verheuevel M.G., Heck M.E.O.C., Pluister G.N., Voss A., Wannet W.J.B., de Neeling A.J., (2006) "Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 26.

Jones T.F., Kellum M.E., Porter S.S., Bell M., Schaffner W., (2002) “An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 82-84.

Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martiniotti M., Monaci M., Pantosti A., (2009) “Community-acquired methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 15,845-847.

Pu S., Han F., Ge B., (2009) Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 75, 265–267.

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission Assessment of the Public Health significance of methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods, (2009) *The EFSA Journal*, 9, 1-73.

Sergio D.M.B., Koh T.H., Hsu L., Ogden B.E., Goh A.L.H., Chow P.K.H., (2007) “Investigation of methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research”. *J. Med. Microbiol.* 56, 1107-1109.

Rijen M.V., Keulen P.V., Kluytmans J., (2007). “Increase of pig and calf MRSA in a Dutch hospital”. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, S446-S447.

Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Kroeger J.S., Tinkler G.P., Moritz E.D., Capuano A.W., Herdwaldt L.A., Diekema D.J., (2009) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE*, 4, 1-6.

Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W., (2003) “Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*” *J. Clin. Microbiol.* 41, 4089-4094.

van Loo I.H.M., Diederer B.M.W., Savelkoul P.H.M., Woudenberg J.H.C., Roosendaal R., van Belkum A., Lemmens-den Toom N., Verhulst C., van Keulen P.H.J., Kluytmans J.A.J.W (2007) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands”. *Emerg. Infect. Dis.* 13,1753-1755.

Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M., (2005) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.

Weese J.S., Reid-Smiyh R., Rousseau J., Avery B., (2010b) “Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* contamination of retail pork” *CVJ*, 51, 749-752.

Weese J.S., Zwambag A., Rosendal T., Reid-Smiyh R., Friendship R., (2010a) “Longitudinal investigation on Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets” *Zoonoses and public health*, 1-6.

# MONITORAGGIO SANITARIO DELLA POPOLAZIONE DI CINGHIALI (*SUS SCROFA*) IN EMILIA-ROMAGNA. RISULTATI DEGLI ANNI 2006-2010

## ***THE MONITORING OF HEALTH STATUS OF WILD BOAR (*SUS SCROFA*) POPULATION IN EMILIA-ROMAGNA REGION. RESULTS OF YEARS 2006-2010***

RUGNA G.<sup>1</sup>, BONILAURI P.<sup>1</sup>, FRASNELLI M.<sup>1</sup>, GARBARINO C.<sup>1</sup>, GELMETTI D.<sup>1</sup>, GRAZIOLI S.<sup>1</sup>, LICATA E.<sup>2</sup>, MASSI P.<sup>1</sup>, PACCIARINI M. L.<sup>1</sup>, PONGOLINI S.<sup>1</sup>, SOZZI E.<sup>1</sup>, TAMBA M.<sup>1</sup>, VICARI N.<sup>1</sup>, MERIALDI G.<sup>1</sup>

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy  
2 Regione Emilia-Romagna. DG Sanità e Politiche Sociali, Bologna*

**Key Words:** *Sus scrofa*, wild boar, health status, monitoring, zoonosis

**Riassunto:** la popolazione del cinghiale (*Sus scrofa*) risulta globalmente in aumento con conseguente incremento del tasso di contatto con specie domestiche e selvatiche e con l'uomo. La conoscenza dell'epidemiologia delle patologie infettive nelle fauna selvatica è importante sia per la salvaguardia del bestiame domestico sia per la sanità pubblica. In questo lavoro sono riportati i risultati di 5 anni di monitoraggio del cinghiale in Emilia Romagna, dal 2006 al 2010. I sieri sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi nei confronti della Malattia Vescicolare Suina (SVD), della Peste Suina Classica (CSF) e della Malattia di Aujeszky (AD); campioni di tessuto muscolare sono stati esaminati per la ricerca di *Trichinella* spp. e di *Toxoplasma* spp. e i visceri sono stati analizzati per la ricerca di *Mycobacterium* spp. e di *Brucella* spp. Nelle 5 stagioni venatorie sono stati esaminati campioni provenienti complessivamente da 39.302 cinghiali. In nessun caso sono stati rilevati anticorpi nei confronti di CSFV (0/9.386) e di SVDV (0/8.503), mentre 2.425/8.238 sieri sono risultati positivi per ADV. Per quest'ultima infezione i valori di prevalenza sono stati del 31,9%, 35,2%, 21,6%, 31,3% e 31,7% rispettivamente negli anni 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010. La sieropravalenza di *Toxoplasma gondii* è risultata del 19%, mentre larve di *Trichinella* spp. sono state isolate in 1/39.302 cinghiali. Il parassita è stato rilevato in un giovane maschio abbattuto alla fine del 2009 ed è stato identificato come *T. pseudospiralis*. Da segnalare l'isolamento, anche se con percentuali molto basse, di microrganismi del MtbC e di *Brucella suis* biovar 2. Le popolazioni di cinghiale risultano infette da ADV in gran parte del mondo con prevalenze diverse. La siero prevalenza riscontrata in Emilia Romagna è alta, per cui sarebbe importante considerare un possibile ruolo del cinghiale come serbatoio della malattia per il suino domestico, in particolare per quello allevato all'aperto. Il monitoraggio costante della circolazione di SVDV e CSFV è fondamentale per la dimostrata connessione epidemiologica con focolai nel suino domestico. Il monitoraggio conferma la scarsa circolazione di *Trichinella* spp. nella popolazione regionale di cinghiale ed ha permesso di rilevare una specie mai isolata precedentemente nei mammiferi italiani. Ulteriori approfondimenti sono necessari per la valutazione del ruolo del cinghiale nell'epidemiologia di tubercolosi e brucellosi.

**Abstract:** The wild boar (*Sus scrofa*) population density is increasing worldwide, leading to a higher contact rate among animal hosts. The knowledge of diseases circulating in wildlife populations is significant not only for conservation and livestock production but also for public health. Here we report the results of a five year monitoring program of wildlife diseases implemented in Emilia-Romagna region, Italy during 2006-2010. Wild boar blood

sera were analysed for the presence of antibodies against Swine Vesicular Disease Virus (SVDV), Classical Swine Fever Virus (CSFV) and Aujeszky's Disease Virus (ADV), samples of muscular tissue were examined for the presence of *Trichinella* spp. larvae and *Toxoplasma* spp. and viscera were analysed for *Mycobacterium* spp. And *Brucella* spp. Samples from 39,302 wild boars were collected during 5 hunting seasons. No antibodies against CSFV (0/9,386) and SVDV (0/8,503) were detected, while 2,425/8,238 sera resulted positive for ADV. The ADV prevalence values were 31.9%, 35.2%, 21.6%, 31.3% and 31.7% in 2006, 2007, 2008, 2009 and 2010, respectively. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* was 19% and *Trichinella* spp. larvae were detected in 1/39,302 wild boar. The parasite was detected in a young male wild boar hunter-killed at the end of December 2009 and was identified as *T. pseudospiralis* by multiplex PCR. *Mycobacterium tuberculosis* complex has been evidenced by PCR in 2 samples. Isolation and typing of the strains is ongoing. *Brucella* spp has been evidenced by PCR in 8/403 samples; the bacterium has been isolated from 3 samples and identified as *Brucella suis* biovar 2. Wild boar populations have been reported to be infected by ADV almost worldwide in variable proportions. The seroprevalence in Emilia Romagna is high, so it may be important to consider the possible role of wild boar as reservoir for domestic pigs, in particular for outdoor pig herds. The continuous monitoring of SVDV and CSFV circulation in wild populations is pivotal for the demonstrated epidemiological connection with domestic swine outbreaks and the significant economic impact of such diseases. The monitoring program confirms the very low circulation of *Trichinella* spp. in the regional wildlife populations; moreover it has allowed to detect a species which had never been reported before in mammalian hosts in Italy. Further studies are necessary to evaluate the role of wild boar in the epidemiology of toxoplasmosis, tuberculosis and brucellosis.

## INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni la densità di popolazione del cinghiale (*Sus scrofa*) nel Mondo è andata incontro ad un incremento notevole, così come si è assistito ad un' ampliamento della diffusione geografica di questa specie; come risultato delle introduzioni, è infatti possibile trovarlo anche in aree lontane dal suo areale originario (Lever, 1994). In Europa, dopo essere scomparso da molte aree verso la fine del XVII secolo, si è assistito ad un nuovo ed intenso incremento delle popolazioni durante l'ultima metà del XX secolo (Ruiz-Fons *et al.*, 2008) e spesso le pratiche di gestione della fauna selvatica hanno portato ad una sovrabbondanza di questa specie in alcune aree (Gortazar *et al.*, 2006). In Emilia Romagna il cinghiale rappresenta una delle specie più diffuse tra ungulati selvatici; si stima che ogni anno durante la stagione viene abbattuto un numero di capi variabile da 10.000 a 17.000. (Zanni M., comunicazione personale)

La presenza sul territorio di popolazioni numerose di cinghiale, pone problemi di interesse sanitario, oltre che ecologico. Questa specie ospita gli agenti eziologici di importanti patologie che possono essere trasmesse al suino domestico ed altre specie animali, uomo compreso. L'aumento della densità di popolazione porta ad un aumento del numero di ospiti suscettibili e ad un aumento del tasso di contatto tra soggetti, con un conseguente possibile aumento del tasso di morbilità delle patologie infettive (Acevedo *et al.*, 2007). Lo spostamento delle persone in aree suburbane, la deforestazione e l'aumento dell'uso del territorio a scopi agricoli, hanno aumentato le possibilità di contatto tra il cinghiale ed il suino domestico e l'uomo. A questo si aggiunge l'attività venatoria sportiva ed il consumo di carne di cinghiale, attività praticate in molte aree geografiche, che aumentano le possibilità di contatto umano con questo ungulato selvatico. Come ultima considerazione, la presenza sul territorio di una specie selvatica che possa fungere da *reservoir* per alcune patologie infettive, può interferire con il successo di campagne di controllo di tali malattie nel bestiame domestico (Meng *et al.*, 2009).

Dalle premesse è evidente l'importanza, per le autorità sanitarie, di monitoraggi periodici dello stato sanitario della fauna selvatica, così come raccomandato dalla Direttiva Comunitaria 92/45/CEE. In Emilia Romagna, a partire dal 2006, è attivo un Piano di Monitoraggio Sanitario della fauna selvatica, che comprende tra le diverse specie il campionamento del cinghiale per la valutazione della presenza o meno di alcune patologie infettive e parassitarie. Di seguito vengono riportate brevemente le patologie oggetto del Piano:

### **Patologie virali**

Malattia di Aujeszky (AD): l'agente eziologico è il *Suid (alpha) herpesvirus 1* (ADV). Gli ospiti naturali dell'infezione sono il cinghiale ed il suino domestico, ma il virus può infettare anche altri mammiferi causando una patologia neurologica letale (Peisak and Truszczynski, 2006). AD è ancora una delle più importanti patologie del suino domestico ed è per questo inclusa nell'elenco OIE delle malattie notificabili. In bibliografia è riportata un'ampia diffusione di ADV nelle popolazioni di cinghiale europeo, con prevalenze che variano tra i diversi Paesi (Albina *et al.*, 2000; Lari *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 1998; Ruiz-Fons *et al.*, 2007; Vengust *et al.*, 2006). L'infezione da ADV nel cinghiale è generalmente asintomatica, ma non è da escludere la possibilità che emergano ceppi nuovi e più virulenti con conseguenze più gravi, soprattutto in popolazioni ad alta densità. Alcuni autori escludono un ruolo di serbatoio del cinghiale nei confronti di questa malattia, altri hanno invece descritto focolai di AD in allevamenti *free-range* di suino domestico, correlati epidemiologicamente ai cinghiali presenti sul territorio (Hars e Rossi, 2005).

Peste Suina Classica (CSF): l'agente eziologico è un *Pestivirus* (CSFV), fam. *Flaviviridae*. Questa patologia, inclusa nelle malattie notificabili della Lista OIE, è un'importante causa di perdite economiche nell'allevamento domestico del suino, poiché prevede l'eradicazione dei focolai con lo *stamping-out*, restrizioni al commercio di animali nelle aree infette e indennizzi agli allevatori. La suscettibilità, le manifestazioni cliniche e le lesioni della PSC, a seguito di infezioni sperimentali, sono identiche sia nel suino che nel cinghiale (Depner *et al.*, 1995)

Il ruolo del cinghiale come specie *reservoir* della patologia è ben dimostrato e diversi sono i report di collegamenti epidemiologici tra quest'ultimo e focolai comparsi nel suino domestico, tra cui alcuni comparsi in Italia nel passato (Rutili *et al.*, 1997). Attualmente CSFV non è presente nel suino domestico dell'Europa Occidentale, mentre circola nelle popolazioni di cinghiali dell'Europa Centrale ed Orientale (Artois *et al.*, 2002).

Malattia Vescicolare (SVD): l'agente eziologico è un *Picornavirus* (SVDV). Sia il suino domestico che il cinghiale sono sensibili alla patologia.

### **Patologie parassitarie**

Trichinellosi: infezione parassitaria il cui agente eziologico è rappresentato da nematodi del genere *Trichinella*, che infestano principalmente specie carnivore, ma anche mammiferi onnivori con comportamento cannibalistico o che si nutrono di carcasse (*scavenging*); alcune trichinelle sono in grado di infettare uccelli e rettili (Gottstein *et al.*, 2009). La trasmissione del parassita è di tipo diretto, mediante ingestione di tessuto muscolare parassitato. L'uomo può rappresentare ospite accidentale di *Trichinella* spp. e l'infestazione avviene per consumo di carni crude o poco cotte. In Europa la fauna selvatica rappresenta il più importante serbatoio di *Trichinella* spp. (Pozio *et al.*, 2009) e ai fini del Regolamento Comunitario 2075/2005/EC, gli Stati membri che intendono ottenere la qualifica di allevamenti suini liberi da *Trichinella*, devono attuare dei piani monitoraggio della fauna selvatica presente sul territorio.

Toxoplasmosi: patologia parassitaria provocata da *Toxoplasma gondii*, protozoo con diffusione geografica mondiale. L'ospite definitivo è rappresentato dai carnivori della Famiglia *Felidae*, nei quali compie la fase di riproduzione sessuale e dai quali viene eliminato nella fase di

oocisti con le feci; gli ospiti intermedi sono rappresentati da tutti gli animali a sangue caldo (mammiferi e uccelli), uomo compreso. Negli ospiti intermedi, *T. gondii* forma cisti che possono essere ritrovate principalmente nei tessuti muscolare e nervoso, occasionalmente in organi viscerali come polmone, fegato, reni (Dubey and Beattie, 1988). Tutti gli stadi del ciclo parassitario (sporozoit nelle oocisti; bradizoiti o tachizoiti nelle cisti tissutali) sono infettanti sia per gli ospiti definitivi che per quelli intermedi. Diversi autori descrivono la diffusa presenza di toxoplasmosi nel cinghiale, che può infettarsi, date le sue abitudini alimentari, anche consumando tessuto muscolare di animali parassitati. La presenza di cisti tissutali in questo animale è una potenziale fonte di infezione per l'uomo.

### **Patologie batteriche**

Tubercolosi: la tubercolosi bovina (bTB) è causata da *Mycobacterium bovis*, un microrganismo appartenente al *Mycobacterium tuberculosis* complex (MtbC). Questi batteri hanno un ampio range di ospiti, sia domestici che selvatici, e possono essere la causa della tubercolosi zoonotica (TB) (Naranjio *et al.*, 2008). Nonostante l'efficacia del test di intradermoreazione nell'identificare i bovini infetti, la patologia non è ancora stata eradicata in molti Paesi, spesso a causa del permanere di *Mycobacterium bovis* in specie della fauna selvatica che fungono da *reservoir* (Amanfu, 2006). Per questo motivo, l'identificazione della specie selvatiche serbatoio è fondamentale per l'implementazioni di piani di controllo efficaci (Gortazar, 2007). Il cinghiale non viene ritenuto un vero e proprio ospite di mantenimento dell'infezione, ma piuttosto un ospite a fondo cieco (*spill over*). Infatti le lesioni sono localizzate principalmente ai linfonodi della testa e l'eliminazione dei micobatteri da parte dei cinghiali infetti è nulla o assai modesta. Tuttavia esso, per le sue caratteristiche trofiche (onnivoro che si ciba volentieri di carcasse di animali morti) rappresenta una ottimale fonte di informazioni circa la presenza della malattia nella popolazione selvatica. Dal punto di vista zoonotico, l'uomo si infetta generalmente attraverso l'inalazione di aerosol contaminato ed il consumo di latte, mentre il consumo di carne non è stato mai documentato come possibile via di trasmissione; il contatto diretto con gli organi ed i tessuti infetti durante lo scuoiamento e l'eviscerazione di animali infetti può invece costituire un rischio importante se avviene il contatto della bocca con le mani (de la Rua-Domenech, 2006).

Brucellosi: la brucellosi è una malattia causata da batteri del genere *Brucella*. Attualmente questo genere comprende 9 specie di cui 3, *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, rappresentano gli agenti eziologici della brucellosi bovina, dei piccolo ruminanti e del suino, patologie importanti sia dal punto di vista economico che di sanità pubblica; *Brucella* spp. può infatti essere trasmessa all'uomo sia per contatto diretto con animali infetti sia per ingestione di prodotti animali contaminati (solitamente latte e prodotti lattiero-caseari); la brucellosi è inoltre una patologia occupazionale (personale di laboratorio e operai del macello), poiché può essere trasmessa per aerosol (Seleem *et al.*, 2010). Il cinghiale, come il suino domestico, è particolarmente suscettibile all'infezione da *Brucella suis*. Questo batterio, che risulta eradicato dall'allevamento suinicolo industriale in Italia, può causare nel suino gravi patologie di tipo riproduttivo. Esistono 3 differenti *biovar* di *Brucella suis*: i *biovar* 1 e 3, particolarmente zoonosici, non sono presenti in Europa. Il *biovar* 2, che non è mai stato identificato come causa di malattia nell'uomo, è stato riscontrato nel cinghiale e nel suino domestico nel vecchio continente (MacMillan *et al.*, 2006)

### **MATERIALI E METODI**

Il Piano di Monitoraggio della Fauna Selvatica attivo sul territorio della Regione Emilia Romagna prevede il prelievo, da tutti i soggetti abbattuti nel corso dell'attività venatoria o nell'ambito dei piani provinciali di controllo, dei seguenti campioni:

a) una porzione di muscolo prelevata dai pilastri del diaframma, per l'esecuzione dei test per

*Trichinella* spp. e *Toxoplasma gondii*. La prima determinazione è eseguita su tutti i campioni prelevati mentre la ricerca di *T. gondii* avviene su un campione rappresentativo.

b) sangue per l'esecuzione degli esami sierologici (SVD, AD, CSF)

Per quanto riguarda il monitoraggio batteriologico il campionamento viene eseguito presso i centri di lavorazione della selvaggina cacciata e consiste nel prelievo di:

c) linfonodi sottomandibolari per la ricerca di *Mycobacterium* spp.

d) milza e testicoli o utero per la ricerca di *Brucella* spp.

I campioni sono stati analizzati (Tabella 1) in diversi laboratori dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I sieri sono stati esaminati con tecniche ELISA, seguendo le procedure raccomandate nel Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2009). Il diaframma per la ricerca di *Trichinella* spp. è stato analizzato con la tecnica della digestione artificiale, come previsto dal Regolamento Comunitario 2075/2005/EC. Su un'altra porzione del muscolo diaframmatico sono stati eseguiti la ricerca diretta di *Toxoplasma gondii* mediante tecnica PCR (Homan *et al.*, 2000) e un test ELISA commerciale (IDVET®) su *meat juice* per l'evidenziazione di anticorpi nei confronti del protozoo. I linfonodi sottomandibolari sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico per l'evidenziazione di lesioni macroscopiche riferibili a forme granulomatose ed in caso positivo sottoposti ad approfondimenti mediante esame istologico, coltura e metodiche di biologia molecolare. La milza e gli organi sessuali (utero o testicoli) sono stati analizzati per la ricerca di *Brucella* spp. mediante tecnica PCR (Bonilauri *et al.*, 2006) e, in caso di positività, sull'omogenato si è provveduto alla ricerca dell'agente eziologico mediante coltura e tipizzazione biochimica e biomolecolare (Bricker *et al.*, 1994; Huber *et al.*, 2009). I ceppi di *Brucella* spp. isolati sono stati inviati al Centro di Referenza OIE per la Brucellosi (IZSAM).

**Tabella 1.** Tecniche di laboratorio eseguite per le diverse patologie oggetto di monitoraggio sanitario

Patologia	Metodo di rilevazione	
	Metodo diretto	Test sierologico
Malattia di Aujeszky		ELISA
Peste Suina Classica		ELISA
Malattia Vescicolare Suina		ELISA
Tubercolosi	PCR, coltura	
Brucellosi	PCR, coltura	
Trichinellosi	digestione artificiale	
Toxoplasmosi	PCR	ELISA

## RISULTATI

Complessivamente sono stati analizzati 39.302 cinghiali, campionati nelle 5 stagioni di caccia a partire dall'anno 2006.

Patologie virali: i risultati, suddivisi per Provincia, sono sintetizzati nelle tabelle 2, 3 e 4. Per quanto riguarda la Peste Suina Classica sono stati esaminati complessivamente 9.386 soggetti, mentre per la Malattia Vescicolare i cinghiali esaminati complessivamente sono stati 8.503. Non sono state riscontrate sieropositività per nessuna delle due patologie. I cinghiali esaminati per Malattia di Aujeszky sono stati 8.238; in questo caso sono state riscontrate percentuali di sieropositività che variano dal 21,6 % al 35,2% .

Provincia	2006		2007		2008		2009		2010	
	esam.	pos.								
Bologna	296	0	207	0	265	0	163	0	288	0
Forlì-Cesena	118	0	77	0	40	0	288	0	569	0
Modena	65	0	96	0	261	0	248	0	142	0
Parma	462	0	377	0	785	0	754	0	637	0
Piacenza	161	0	112	0	591	0	538	0	698	0
Ravenna	18	0	78	0	80	0	36	0	47	0
Reggio Emilia	261	0	83	0	27	0	29	0	40	0
Rimini	3	0	47	0	32	0	118	0	249	0
<b>Emilia Romagna</b>	<b>1384</b>	<b>0</b>	<b>1077</b>	<b>0</b>	<b>2081</b>	<b>0</b>	<b>2174</b>	<b>0</b>	<b>2670</b>	<b>0</b>

**Tabella 2.** Risultati sierologici per Peste Suina Classica

Provincia	2006		2007		2008		2009		2010	
	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.
Bologna	294	0	206	0	253	0	174	0	289	0
Forlì-Cesena	115	0	70	0	40	0	333	0	575	0
Modena	65	0	93	0	261	0	271	0	142	0
Parma	45	0	21	0	770	0	735	0	640	0
Piacenza	113	0	10	0	573	0	532	0	700	0
Ravenna	18	0	78	0	80	0	46	0	50	0
Reggio Emilia	260	0	84	0	27	0	29	0	40	0
Rimini	4	0	49	0	32	0	131	0	255	0
<b>Emilia Romagna</b>	<b>914</b>	<b>0</b>	<b>611</b>	<b>0</b>	<b>2036</b>	<b>0</b>	<b>2251</b>	<b>0</b>	<b>2691</b>	<b>0</b>

**Tabella 3.** Risultati sierologici per Malattia Vescicolare Suina

Provincia	2006			2007			2008			2009			2010		
	esam.	pos.	% pos	esam.	pos.	% pos	esam.	pos.	% pos	esam.	pos.	% pos	esam.	pos.	% pos
Bologna	287	116	40,4%	207	96	46,4%	245	61	24,9%	162	57	35,2%	279	96	34,4%
Forlì-Cesena	89	16	18,0%	70	12	17,1%	39	9	23,1%	279	83	29,7%	537	186	34,6%
Modena	62	12	19,4%	86	30	34,9%	249	57	22,9%	245	79	32,2%	145	46	31,7%
Parma	77	24	31,2%	52	20	38,5%	755	153	20,3%	723	233	32,2%	625	230	36,8%
Piacenza	113	27	23,9%	8	2	25,0%	561	137	24,4%	523	174	33,3%	689	225	32,7%
Ravenna	18	4	22,2%	78	11	14,1%	77	8	10,4%	37	9	24,3%	42	10	23,8%
Reggio E.	256	89	34,8%	82	39	47,6%	27	0	0,0%	24	10	41,7%	40	11	27,5%
Rimini	3	1	33,3%	48	12	25,0%	32	3	9,4%	118	16	13,6%	249	21	8,4%
<b>Emilia Romagna</b>	<b>905</b>	<b>289</b>	<b>31,9%</b>	<b>631</b>	<b>222</b>	<b>35,2%</b>	<b>1985</b>	<b>428</b>	<b>21,6%</b>	<b>2111</b>	<b>661</b>	<b>31,3%</b>	<b>2606</b>	<b>825</b>	<b>31,7%</b>

**Tabella 4.** Risultati sierologici per Malattia di Aujeszky

Patologie batteriche: le indagini per la ricerca di agenti eziologici di natura batterica sono state inserite nel Piano Regionale di Monitoraggio a partire dal 2010. Sono stati esaminati in tutto 414 cinghiali per l'evidenziazione di lesioni tubercolari e 403 soggetti per *Brucella* spp. (Tabella 5). Sui linfonodi sottomandibolari di 8 cinghiali sono state riscontrate lesioni anatomo-patologiche macroscopiche di tipo infiammatorio cronico; l'esame istologico ha confermato la presenza di lesioni granulomatose in 7 campioni, di cui 4 riferibili a micobatteriosi (3 in provincia di Piacenza e 1 in provincia di Parma). Gli esami colturali per la tipizzazione sono ancora in corso su tutti i campioni. Da due linfonodi la PCR ha rilevato positività per batteri del MtbC.

Per quanto riguarda la brucellosi sono risultati positivi a *Brucella* spp. 8 cinghiali, mediante

tecnica PCR. Le colture batteriche eseguite dagli organi positivi hanno permesso l'isolamento del batterio in 3 casi; la tipizzazione biochimica e biomolecolare ha attribuito l'infezione alla specie *Brucella suis* biovar 2 in tutti i casi. I ceppi sono in corso di ulteriori approfondimenti diagnostici presso il Centro di Referenza OIE per la Brucellosi (IZSAM)

Provincia	<i>Brucella</i> spp.		<i>Mycobacterium</i> spp.			
	esam.	pos.	esame ispettivo		istologia	MtbC PCR
			esam.	pos.	pos.*	pos.
Bologna	123	4	147			
Forlì-Cesena	53		35			
Modena	16		16			
Parma	3		6	2	2	1
Piacenza	127	3	153	6	5	1
Ravenna	53	1	29			
Reggio Emilia	28		26			
Rimini			2			
<b>Emilia Romagna</b>	<b>403</b>	<b>8</b>	<b>414</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>2</b>

**Tabella 5.** Risultati delle indagini per patologie batteriche

\* evidenziate lesioni granulomatose

**Patologie parassitarie:** nel corso dei 5 anni sono stati analizzati per la ricerca di *Trichinella* spp. 39.302 cinghiali (tabella 7). Nel 2010, un cinghiale abbattuto nella Provincia di Bologna è risultato positivo a *Trichinella pseudospiralis*. A partire dal 2010 è stata eseguita la ricerca di *Toxoplasma gondii*, per la quale sono stati esaminati complessivamente 723 cinghiali (Tabella 6). Solo in un soggetto si è avuta positività in PCR, mentre dalla sierologia eseguita su *meat juice* è stata riscontrata una percentuale di positività del 19%.

Provincia	PCR		ELISA	
	esam.	pos.	esam.	pos (%)
Bologna	68	0	10	1 (10%)
Forlì-Cesena	98	0	77	8 (10,4%)
Modena	112	0	34	13 (38,2%)
Parma	114	1		
Piacenza	89	0	29	7 (24,1%)
Ravenna	38	0		
Reggio Emilia	119	0	13	2 (15,4%)
Rimini	85	0		
<b>Emilia Romagna</b>	<b>723</b>	<b>1</b>	<b>163</b>	<b>31 (19%)</b>

**Tabella 6.** Risultati della ricerca di *T. gondii*

Provincia	2006		2007		2008		2009		2010	
	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.	esam.	pos.
Bologna	1249	0	3917	0	4031	0	3139	0	3509	1
Ferrara					3	0				
Forlì-Cesena	101	0	101	0	42	0	418	0	841	0
Modena	1721	0	2112	0	1945	0	1749	0	1751	0
Parma	73	0	45	0	1936	0	1472	0	1284	0
Piacenza	106	0	156	0	741	0	716	0	1240	0
Ravenna	5	0	85	0	79	0	44	0	46	0
Reggio Emilia	253	0	131	0	38	0	1366	0	1774	0
Rimini	6	0	77	0	49	0	129	0	822	0
<b>Emilia Romagna</b>	<b>3514</b>	<b>0</b>	<b>6624</b>	<b>0</b>	<b>8864</b>	<b>0</b>	<b>9033</b>	<b>0</b>	<b>11267</b>	<b>1</b>

**Tabella 7.** Risultati della ricerca di *Trichinella* spp.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come atteso in base alla situazione epidemiologica locale, i dati raccolti nel quinquennio 2006-2010 non indicano circolazione dei virus della Peste Suina Classica e della Malattia Vescicolare nella popolazione studiata. Le evidenze degli ultimi decenni hanno chiaramente dimostrato il ruolo di serbatoio che il cinghiale può assumere nei confronti del CSFV. I focolai nel cinghiale sono solitamente auto-limitanti, ma sono descritti casi in cui la circolazione del virus nella popolazione di cinghiale ha avuto durata di diversi anni (Laddomada, 2000). E' chiaro che in tali situazioni il rischio di trasmissione del virus al suino domestico rimane elevato, come dimostrato da periodiche reintroduzioni della patologia in alcuni Stati europei, con una chiara correlazione epidemiologica con cinghiali infetti presenti sul territorio (Meng *et al.*, 2009). La sieroprevalenza nei confronti della Malattia di Aujeszky risulta dal 2006 su un valore medio del 30,6%, comparabile con quanto riportato in molti altri Paesi, come Slovenia (31%), Spagna (36%), USA (38%) (Meng *et al.*, 2009) ed in un'altra regione italiana in un'indagine precedente (Capua *et al.*, 1997). Alcuni autori (Muller *et al.*, 1997) ritengono che il cinghiale non sia il *reservoir* della patologia per il suino domestico, sulla base delle differenze biomolecolari dei ceppi isolati dalle due popolazioni. Ulteriori approfondimenti andrebbero comunque condotti a questo proposito, dato che la trasmissione reciproca del virus è possibile ed è stata dimostrata con infezioni sperimentali (Muller *et al.*, 2001).

Da indagini sierologiche condotte in diversi Paesi risulta una notevole diffusione di *Brucella* spp. nei cinghiali. I valori di sieroprevalenza variano dal 20% al 30% in Italia, USA, Spagna, Germania e Croazia (Ebani *et al.*, 2003; Gresham *et al.*, 2002; Ruiz-Fon *et al.*, 2006; Al Dahouk *et al.*, 2006; Cvetnic *et al.*, 2003); in quest'ultimo Stato il cinghiale viene considerato *reservoir* di *Brucella suis* biovar 2. Dal nostro studio, in cui è stata condotta la ricerca diretta dell'agente eziologico, viene confermata la circolazione di *Brucella suis* biovar 2, che rappresenta il biovar meno patogeno per l'uomo (EFSA, 2009).

Per quanto riguarda la tubercolosi, nel nostro lavoro è stata riscontrata una prevalenza molto bassa di cinghiali con lesioni granulomatose, compatibili con micobatteriosi, ai linfonodi sottomandibolari. L'isolamento batterico ed ulteriori approfondimenti tramite metodiche di biologia molecolare sono ancora in corso per poter arrivare ad una tipizzazione di specie. Quest'ultimo dato risulterà di fondamentale importanza quindi per valutare l'impatto sanitario del dato. Va ricordato, infatti, che nella confinante Lombardia da questo tipo di lesioni nel cinghiale risulta preponderante l'isolamento di *Mycobacterium microti*, microrganismo endemico in alcune specie di roditori selvatici e di scarsa o nulla rilevanza sanitaria per gli animali domestici e per l'uomo (Gaffuri *et al.* 2009). Il ruolo del cinghiale nell'epidemiologia della tubercolosi bovina è stato ampiamente dibattuto con pareri discordanti sulla possibilità che il cinghiale possa essere o meno la fonte di infezione per il bestiame domestico. Sicuramente in regioni in cui le prevalenze risultano elevate non può non essere considerato il rischio zoonotico diretto, soprattutto per alcune categorie come veterinari e cacciatori.

In Europa è stata ampiamente documentata la circolazione di *Toxoplasma gondii* nelle popolazioni di cinghiale: in Repubblica Ceca è stata descritta una siero prevalenza del 26,2% (Bartova *et al.*, 2006), in Spagna del 36,3% (Ruiz-Fons *et al.*, 2006) e in Slovacchia del 38,5% (Catar, 1972). Il dato rilevato dal piano di monitoraggio dell'Emilia Romagna (19%) dimostra la circolazione anche su questo territorio. L'ampia diffusione del protozoo nei cinghiali trova motivo nell'esposizione ad ambienti con alta fecalizzazione da felidi o nel comportamento di cannibalismo che questa specie manifesta. La rilevazione diretta (PCR) di *T. gondii* rilevata dal nostro studio in un solo soggetto appare in contrasto con l'ampia circolazione dimostrata dalla sierologia e ciò potrebbe essere spiegato da una bassa carica di cisti parassitarie nei soggetti infestati; si rendono necessari quindi approfondimenti per

la messa a punto di questa metodica diagnostica, in relazione soprattutto al prelievo ed alla preparazione della matrice, per una sua possibile applicazione ad indagini epidemiologiche. Sebbene sia riportato in bibliografia un solo focolaio documentato di toxoplasmosi umana legata al consumo di cinghiale (Choi *et al.*, 1997), i livelli di prevalenza suggeriscono che non sia da sottovalutare la possibilità di infezione derivante dall'ingestione o manipolazione di carni di questo animale. *Trichinella* spp. ha una diffusione importante in molte aree geografiche e diversi sono i focolai provocati dal consumo di carni di cinghiale che non abbiano subito un efficace trattamento termico. Il monitoraggio condotto sistematicamente dal 2006 su tutti i cinghiali abbattuti ha rilevato assenza di circolazione di *T. spiralis* e *T. britovi*, quest'ultima presente nella fauna selvatica italiana, in particolare nelle volpi, e che sono i principali responsabili di focolai umani in Europa. Da segnalare l'isolamento, in un solo soggetto della provincia di Bologna, di *T. pseudospiralis*, che rappresenta in Italia il primo caso di infezione documentata in un mammifero e che è stata descritta come responsabile di focolai umani in Thailandia (Jongwutiwes *et al.*, 1998).

Il piano di monitoraggio del cinghiale attivo in Emilia Romagna dal 2006 ha permesso di raccogliere importanti informazioni sullo stato sanitario della specie in merito all'epidemiologia di malattie infettive di rilevanza per l'allevamento del suino domestico oltre che per la sanità pubblica. La mole di dati raccolta permette di considerare attualmente trascurabile il rischio di diffusione al suino domestico di patologie virali come la Peste Suina Classica e la Malattia Vescicolare del Suino. La circolazione del virus della Malattia di Aujeszky suggerisce invece l'importanza della sistematicità dei controlli per comprendere la possibile interferenza che la presenza nei cinghiali potrebbe avere nei confronti del piano di eradicazione del virus dal territorio regionale. In aggiunta a questo la presenza di infezioni quali la Toxoplasmosi, la Brucellosi suina e la Trichinellosi, seppure a livelli apparentemente contenuti, suggeriscono un mantenimento di strette misure di biosicurezza atte a prevenire i contatti far il cinghiale ed il suino domestico.

## BIBLIOGRAFIA

- Acevedo P., Escudero M.A., Munoz R., Gortazar C. (2006) Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain. *Acta Theriologica*, 51: 327-336
- Al Daohuc S. *et al.* (2005) Seroprevalence of brucellosis, tularaemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 52: 444-455
- Amanfu W. (2006) The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*, 86: 330-335
- Artois M., Depner K.R., Guberti V., Hars J., Rossi S., Rutili D. (2002) Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Revue Scientifique et Technique, Office Internationale Epizooties*, 21: 287-303
- Albina E., Mesplède A., Chenut G., Le Potier M.F., Bourbao G., Le Gal S., Leforban Y. (2000) A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*, 77: 43-57
- Bartova E., Sedlak K., Literak I. (2006) Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora Caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 142-153
- Bonilauri P. Meriardi G., Dottori M. (2006) Sviluppo e validazione di una real time PCR con sonde a ibridazione per la rapida determinazione della presenza di *Brucella* spp. in campioni di latte. *Atti del VIII Convegno SIDiLV, Perugia, 9-10 Novembre 2006*, pp. 255-256

- Bricker B.J., Halling S.M. (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2660-2666
- Capua I., Casaccia C., Calzetta G., Caporale V. (1997) Characterisation of Aujeszky's disease virus isolated from domestic animals and wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*, 57: 143-149
- Catar G. (1972) Studies on toxoplasmosis as regards its natural focality in Slovakia. *Folia Parasitol. Prague*, 19: 253-256
- Choi W.Y., Nam H.W., Kwak N.H., Huh W., Kim Y.R., Kang M.W., Cho S.Y., Dubey J.P. (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 175: 1280-1282
- Cvetnic Z. *et al.* (2003) Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Ve. Hung.*, 51: 465-473
- de la Rua-Domenech R. (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom : Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 86: 77-109
- Depner K.R., Muller A., Gruber A., Rodriguez A., Bickhardt K., Liess B (1995) Classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) – experimental infections and viral persistence. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 102: 381-384
- Ebani V. V., Cerri D., Poli A., Andreani E. (2003) Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boar (*Sus scrofa* ) in Tuscany, Italy. *Journal of wildlife Diseases*, 39: 718-722
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. The EFSA Journal, 1144: 1-112
- Gaffuri A., Boniotti B., Sacchi C., Bertoletti I., Zanoni M.G. and Pacciarini M. (2009) Tuberculosis Control Program In Wildlife In Italy: Strategies And Results. Fifth International *M. bovis* Conference, 25-28 August 2009 Wellington, New Zealand
- Gortazar C., Acevedo P., Ruiz-Fons F., Vicente J. (2006) Disease risks and overabundance of game species. *Eur. J. Wildl. Res.*, 52: 81-87
- Gottstein B., Pozio E., Nokler K. (2009) Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 127-145
- Gresham C.S., Gresham C.A., Duffy M.J., Faulkner C.T., Patton S. (2002) Increased prevalence of *Brucella suis* and pseudorabies virus antibodies in adults of an isolated feral swine population in coastal South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases*, 38: 653-656
- Hars J., Rossi S. (2005) Actualités dans le domaine de la surveillance des maladies transmissibles en France (peste porcine classique, maladie 'dAujeszky, tuberculose, brucellose, leptospirose, trichinellose, influenza aviaire, virus West Nile). *Proceedings of the 23èmes Rencontres du GEEFSM, Val 'dOrdino, Andorre*
- Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J., Verschueren H. (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 30: 69-75
- Huber B., Scholz H.C., Lucero N., Busse H.J. (2009) Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int. J. Med. Microbiol.*, 299: 563-573
- Jongwutiwes S. *et al* (1998) First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *Clin. Infect. Dis.*, 26: 111-115
- Laddomada A. (2000) Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Veterinary Microbiology*, 73: 121-130
- Lari A., Lorenzi D., Nigrelli D., Brocchi E., Faccini S., Poli A. (2006) Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 42 (2): 319-324
- MacMillan A.P., Schleicher H., Korslund J., Soffregen W. (2006) "Brucellosis" in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 9a ed., Blackwell

Publishing, pp. 603-612

- Lever C. (1994) *Naturalised Animals: The Ecology of Successfully Introduced Species*. University Press, Cambridge, UK
- Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **364**: 2697-2707
- Muller T., Teuffert J., Zellmer K., Staubach C., Klupp B., Otte J., Conraths F.J. (1997) Pseudorabies virus infections in the European wild boar – A potential danger for domestic pigs? *Epidemiologie Santé Animale*, **1**: 31-32
- Muller T., Teuffert J., Ziedler K., Possardt C., Kramer M., Staubach C., Conraths F.J. (1998) Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, **34** (2): 251-258
- Muller T., Teuffert J., Zellmer K., Conraths F.J. (2001) Experimental infection of European wild boar and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence. *American Journal of Veterinary Research*, **62**: 252-258
- OIE (2009) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial Animals*. <http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> Ultimo accesso gennaio 2011
- Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. (2008) Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Veterinary Microbiology*, **127**: 1-9
- Pejsak Z.K., Trusczyński M.J. (2006) “Aujeszky Disease (pseudorabies)” in Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 9a ed., Blackwell Publishing, pp 419-433
- Pozio E., Rinaldi E., Marucci G., Musella V., Galati F., Cringoli G., Boireau P., La Rosa G. (2009) Hots and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *International Journal for Parasitology*, **39**: 71-79
- Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Hofle U., Villanua D., Gauss C., Segales J., Almeria S., Montoro V., Gortazar C. (2006) Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain. The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, **65**: 731-743
- Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Vicente J., Gortazar C. (2007) *Veterinary Microbiology*, **120**: 241-250
- Ruiz-Fons F., Segalés J., Gortazar C. (2008) A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. *The Veterinary Journal*, **176**: 158-169
- Ruiz-Fons F. (2006) Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, **65**: 731-743
- Rutili G. (1997) “Country report on classical swine fever in Italy” in Report on Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Vienna, Austria. Commission of the European Communities, Document VI/7888/97, p. 13
- Vengust G., Valenkak Z., Bidovec A. (2006) A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *J. Vet. Med. B*, **53**: 24-27

# **SIEROTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* ISOLATI DAL SUINO NEL NORD ITALIA: AGGIORNAMENTO DEI RISULTATI**

## ***UPDATE ON SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF HAEMOPHILUS PARASUIS ISOLATES FROM PIGS IN NORTHERN ITALY***

IODICE G.<sup>2</sup>, GHERPELLI Y.<sup>1</sup>, BONILAURI P.<sup>1</sup>, MAIOLI G.<sup>1</sup>, DOTTORI M.<sup>1</sup>, MERIALDI G.,<sup>1</sup> LEONELLI R.<sup>1</sup>, MERENDA M.<sup>1</sup>, BIASI G.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>

*1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna  
2- Veterinario Libero Professionista*

**Parole chiave:** *Haemophilus parasuis*, immunodiffusione in agar gel, emoagglutinazione indiretta

**Key words:** *Haemophilus parasuis*, agar gel immunodiffusion, indirect haemoagglutination

**Riassunto.** Nel periodo 2007-2010 sono stati sierotipizzati 53 ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da altrettanti suini conferiti per accertamenti diagnostici presso la Sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Questi, sono stati sottoposti a sierotipizzazione impiegando il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) il quale ha previsto l'adozione di antisieri policlonali di coniglio prodotti 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.

Diciannove dei suddetti ceppi, quelli relativi al periodo 2009-2010, sono stati ulteriormente testati mediante l'impiego della metodica di Emoagglutinazione Indiretta (IHA) presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory di Hannover dove sono stati utilizzati gli antisieri nei confronti di tutti i 15 sierotipi. Per questi ceppi è stato eseguito un confronto tra i risultati ottenuti con le due metodiche sopraccitate.

L'attività di sierotipizzazione ha evidenziato una netta prevalenza dei sierotipi 4 (32,08%), 13 (20,75%) e 5 (15,09%) confermando i risultati riportati in pubblicazioni precedenti sull'argomento. I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 24,53% di quelli esaminati. Il confronto tra AGID ed IHA ha fatto registrare risultati sovrapponibili per 14 ceppi su 19. Nei restanti 5 casi ai ceppi di *H. parasuis* non è stato assegnato alcun sierotipo a causa di fenomeni di cross-reazione (3/19) e di risultati contrastanti tra le due metodiche (2/19).

I risultati ottenuti hanno portato all'adozione di un protocollo diagnostico che prevede l'utilizzo dei due test in serie, impiegando l'AGID come test di screening e l'IHA come test alternativo e di conferma nei casi di mancata tipizzazione con il test AGID.

**Abstract .** From 2007-2009 a total of 53 *Haemophilus parasuis* field isolates were serotyped by Istituto Zooprofilattico of Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The serotyping was made by agar gel immunodiffusion test (AGID) 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. Nineteen *H.parasuis* strains isolated from 2009 were serotyped using both AGID and IHA test, this last by the Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory of Hannover, using antisera against all 15 serotype. The comparison of results between AGID and IHA was made.

In our study serovar 4 was the most prevalent (32,08%) followed by serovar 13 (20,75%) and serovar 5 (15,09%), while 24,53% of the isolates could not be assigned to a serovar (nontypable isolates). The two tests used showed a perfect agreement in 14 cases out of 19. Three isolates be unable to be assigned to a serovar due to cross reactions in IHA test and two more strains were not serotyped due to the disagreement between the two methods used. The combined use of the AGID (screening method) and IHA, as confirmatory method for nontypable strains, could improve the *H. parasuis* serotyping results.

## INTRODUZIONE

*Haemophilus parasuis* è un batterio Gram- agente eziologico della malattia di Glässer del suino, caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente.

Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento di fattori stressanti e il concomitante sviluppo di patogeni “door opener” come il PRRSV, hanno permesso che *H. parasuis* divenisse un problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari.

Ad oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H. parasuis* con prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, studi di sierotipizzazione eseguiti in diversi Paesi dimostrano che i sierotipi 4, 5 e 13 risultano essere i più frequenti mentre altri come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrano prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Tab. 1).

**Tab. 1:** Prevalenza dei sierotipi di *H. parasuis* isolati in diverse aree geografiche (Luppi et al., 2010a).

**Tab. 1:** *H. parasuis* serovars prevalence and geographical origin (Luppi et al., 2010a).

AREA GEOGRAFICA	Sierotipo (%)
Australia <sup>a</sup>	5 (23%), 13 (19%), 4 (13%), 9 (6%), 1 (3%), 2 (3%), 12 (3%), NT* (29%)
Canada <sup>b</sup>	5 (24%), 4 (16%), 13 (11%), 14 (9%), 2 (8%), 12 (7%), NT* (15%)
USA <sup>c</sup>	4 (39%), 3 (8%), 12 (7%), 1 (7%), 2 (4%), 14 (3%), NT* (27%)
Danimarca <sup>d</sup>	5 (36%), 13 (22%), 4 (13%), NT* (15%)
Spagna <sup>e</sup>	5 (18%), 4 (16%), 2 (9%), 13 (8%), 7 (4%), NT* (29%)
Germania <sup>f</sup>	5 (24%), 4 (17%), 2 (5%), 13 (4%), 12 (3%), 7 (2%), NT* (26%)
Cina <sup>g</sup>	4 (24%), 5 (19%), 13 (12%), 14 (7%), 12 (7%), NT* (12%)

(<sup>a</sup>Blakall et al., 1996; <sup>b</sup>Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; <sup>c</sup>Oliveira et al., 2003; <sup>d</sup>Angen et al., 2004; <sup>e</sup>Rubies et al., 1999; <sup>f</sup>Kielstein and Wuthe, 1998; <sup>g</sup>Cai et al., 2005; \*Non tipizzabili).

Detti 15 sierotipi di *H. parasuis* sono stati ulteriormente suddivisi in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Tab. 2).

**Tab. 2:** *Virulenza dei sierotipi di H. parasuis su suini SPF (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).*

**Tab. 2:** *Serovars virulence evaluation in SPF pig (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).*

<b>SIEROTIPO</b>	<b>VIRULENZA</b>
<b>1, 5, 10, 12, 13, 14</b>	Morte entro 96 ore
<b>2, 4, 15</b>	Grave polisierosite e poliartrite alla necropsopia
<b>8</b>	Sintomi clinici e lesioni lievi
<b>3, 6, 7, 9, 11</b>	Assenza di sintomi e 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. Queste considerazioni, associate alla diversità antigenica riconosciuta tra i vari sierotipi e all'elevata presenza di ceppi classificati come non tipizzabili, sottolineano 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).

Il presente lavoro si pone due principali obiettivi:

- Aggiornamento ed integrazione dei dati di prevalenza dei sierotipi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2010, rispetto ad un precedente lavoro (Luppi et al., 2010a)
- comparazione dei risultati ottenuti con l'impiego dell'emoagglutinazione indiretta (IHA) e dell'immunodiffusione in gel di agar (AGID) applicate ai ceppi isolati nel periodo 2009-2010.

## **MATERIALI E METODI**

### **Campionamento ed indagini batteriologiche**

Nel periodo 2007-2010, il materiale patologico conferito per accertamenti diagnostici presso la Sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER, è stato sottoposto alle indagini di laboratorio ritenute più opportune sulla base dei quadri anatomopatologici osservati.

In presenza di lesioni riferibili a polmonite, broncopolmonite, pleurite fibrinosa e polisierosite sono stati campionati i polmoni, il liquido pericardico, il liquido cefalorachidiano ed il liquido sinoviale. Queste matrici sono state utilizzate per l'esame batteriologico attraverso la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con Nicotinammide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato ulteriormente arricchito con uno striscio di *Staphylococcus aureus* che, grazie alla sua capacità di produrre fattore V, ha permesso la crescita di quei patogeni NAD-dipendenti come *H. parasuis*.

La successiva 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 CO<sub>2</sub> per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione lo sviluppo di *H. parasuis* è stato confermato 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).

### Sierotipizzazione di *H. parasuis* mediante AGID ed IHA

I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati tipizzati presso la sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER mediante il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), con l'impiego di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13. La scelta di questi antisieri, acquistati presso il Gallant Custom Laboratory (Canada), è avvenuta sulla base di dati di prevalenza e di patogenicità raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi Paesi (Tab. 1 e 2). Il protocollo impiegato ha previsto le fasi descritte da Luppi et al. nel 2010.

I ceppi isolati a partire dal 2009, sono stati sierotipizzati impiegando sia l'AGID sia una metodica di Emoagglutinazione Indiretta (IHA), come descritto da Turni e Blackall nel 2005. Il test IHA è stato eseguito presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory di Hannover, impiegando gli antisieri nei confronti di tutti i 15 sierotipi di *H. parasuis* conosciuti.

### RISULTATI

I 53 ceppi di *H. parasuis* sono stati identificati come sierotipo 4 (32,08%), sierotipo 13 (20,75%), sierotipo 5 (15,09%), sierotipo 2 (5,66%) e sierotipo 12 (1,89%) mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 24,53% (Tabella 3).

Trentadue ceppi di *H. parasuis* sono stati isolati da casi di polisierosite (forma sistemica) con una netta prevalenza dei sierotipi 4 (40,62%) e 13 (21,87%). Nei restanti 21 casi l'esame anatomopatologico ha fatto registrare esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale ed i ceppi appartenenti ai sierotipi 4, 5 e 13 sono risultati egualmente rappresentati (Tabella 3).

L'applicazione combinata dell'AGID e dell'IHA su 19 ceppi di *H. parasuis* nel periodo 2009-2010 ha fornito risultati sovrapponibili in 14 casi su 19. In 5 casi non è stato possibile sierotipizzare correttamente i ceppi in esame a causa di risultati discordanti tra le due metodiche (2/5) e di fenomeni di cross-reazione (3/5). In questi ultimi 3 casi il test IHA ha rilevato più di un sierotipo per ogni ceppo analizzato ottenendo una contemporanea positività rispettivamente ai sierotipi 1 e 15, 2 e 15, 5 e 15. Questi stessi ceppi sono risultati non tipizzabili in AGID (Tabella 4).

**Tab. 3:** Risultati del test AGID relativi ai ceppi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2010 suddivisi sulla base delle lesioni anatomopatologiche.

**Tab. 3:** *H. parasuis* serovars prevalence and gross lesions observed.

SIEROTIPO	ANATOMOPATOLOGICO		TOTALE
	Polisierosite fibrinosa	Broncopolmonite	
2	3 (9,38%)	0	3 (5,66%)
4	13 (40,62%)	4 (19,05%)	17 (32,08%)
5	4 (12,5%)	4 (19,05%)	8 (15,09%)
12	0	1 (4,76%)	1 (1,89%)
13	7 (21,87%)	4 (19,05%)	11 (20,75%)
NT*	5 (15,63%)	8 (38,09%)	13 (24,53%)
<b>TOTALE</b>	32	21	53

(\*non tipizzabile)

Gli isolamenti batterici concomitanti a *H. parasuis* sono risultati in ordine di frequenza: *P. multocida* (12/53), *S. suis* (5/53), *A. pleuropneumoniae* (3/53), *B. bronchiseptica* (2/53) e *A. pyogenes* (1/53).

**Tab. 4:** Risultati dei test di sierotipizzazione di *H. parasuis* eseguiti sui ceppi isolati nel biennio 2009-2010.

**Tab. 4:** Serological typization of *H. parasuis* isolates in the last two years period (2009-2010).

SIEROTIPI		AGID <sup>b</sup>							
		2	4	5	12	13	NT <sup>c</sup>	CR <sup>d</sup>	TOT
IHA <sup>a</sup>	2	2							2
	4		8						8
	5			1					1
	7		2						2
	12				1				1
	13					2			2
	NT <sup>c</sup>								-
	CR <sup>d</sup>						3		3
	<b>TOT</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>19</b>

(<sup>a</sup>Emoagglutinazione Indiretta; <sup>b</sup>Immunodiffusione in Gel di Agar; <sup>c</sup>Non tipizzabile; <sup>d</sup>Cross-reazione)

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'attività di sierotipizzazione ha evidenziato una netta prevalenza dei sierotipi 4 (32,08%), 13 (20,75%) e 5 (15,09%) confermando il dato ottenuto in un precedente lavoro sull'argomento (Luppi et al., 2010a). I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 24,53% di quelli esaminati. Relativamente a quest'ultimo dato non è possibile scindere la reale percentuale dei ceppi non tipizzabili da quella dei ceppi non tipizzabili con gli antisieri adottati, ciononostante risulta essere sovrapponibile a quanto riportato in altri lavori scientifici sull'argomento (Tabella 1).

Valutando i risultati indicati in Tabella 3, che riportano l'associazione tra il sierotipo isolato e le lesioni anatomopatologiche rilevate, si evince una maggior frequenza dei sierotipi 4 e 13 nelle forme sistemiche piuttosto che nei casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (broncopolmonite). Per contro, l'isolamento del sierotipo 5 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite risulta sovrapponibile e i ceppi non tipizzabili sono stati rilevati più frequentemente in associazione alle forme cosiddette non sistemiche. Questa osservazione si trova in contrasto con quanto riportato da Angen et al. nel 2004, che descrive una prevalenza del sierotipo 4 in forme non sistemiche rispetto a quelle di 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).

La comparazione dei risultati ottenuti con l'applicazione dell'AGID e dell'IHA evidenzia una buona concordanza tra le due metodiche. In 14 casi su 19 è stato assegnato lo stesso sierotipo con entrambe le metodiche. In tre casi i risultati sono stati considerati non conformi a causa della positività riscontrata con l'IHA contemporaneamente nei confronti di due sierotipi (1 e 15; 2 e 15; 5 e 15 rispettivamente). L'impiego dell'IHA con l'uso di diluizioni progressive del siero in prove comparative permette, all'interno delle reazioni crociate, di differenziare una reazione propria da una aspecifica (Del Rio et al., 2003). Tuttavia, anche l'impiego di

questa procedura non ha permesso di assegnare correttamente il sierotipo di appartenenza ai tre ceppi in esame ed il risultato ottenuto è stato considerato come causa di fenomeni di cross-reazione.

In due casi sono stati rilevati risultati discordanti tra le metodiche impiegate, dove due ceppi sono stati identificati come sierotipo 4 tramite AGID e come sierotipo 7 con l'impiego dell'IHA. I due ceppi di *H. parasuis* sopraccitati sono stati isolati da polmoni di animali con evidenti quadri di polisierosite, in assenza di altri patogeni batterici. Sulla base della classificazione della patogenicità di Kielstein and Rapp-Gabrielson del 1992 (Tab. 2) il sierotipo 7 è considerato non patogeno mentre, come già accennato, il sierotipo 4 è riconosciuto come agente di polisierosite nel suino. Relativamente a queste valutazioni si ritiene che il risultato ottenuto tramite AGID sia da considerarsi più attendibile rispetto all'esito fornito dall'IHA. I risultati ottenuti dalla comparazione delle due metodiche necessitano di ulteriori approfondimenti impiegando un numero maggiore di ceppi. Sebbene l'IHA venga descritta come metodica in grado di avere un minor numero di ceppi non tipizzabili rispetto all'AGID, risulta essere estremamente indagiosa (Cai et al., 2005; Tadjine et al., 2004). Pertanto, da un punto di vista metodologico la sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* può avvalersi dell'impiego in serie di entrambe le metodiche descritte. L'adozione dell'AGID come test di screening e l'impiego dall'IHA come test di conferma nei casi di mancata tipizzazione con l'AGID, può rappresentare un buon compromesso in grado di ridurre i tempi di risposta ed i costi di realizzazione, pur mantenendo una elevata percentuale di ceppi tipizzati.

## BIBLIOGRAFIA

Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103, 255-258.

1. 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.

2. 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.

3. Del Rio M.L., Gutiérrez C.B., and Rodriguez Ferri E.F. (2003). Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Test for Serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 880-882.

4. 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.

5. Kielstein P. and Wuthe H-H. (1998). Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and related bacteria from the organs of pigs in Schleswig-Holstein. *Tierärztl Umschau* 53, 250-258.

6. Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. (2010a). Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici. *Atti XXXVI Meeting Annuale SIPAS. Montichiari 25-26 Marzo 2010*.

7. Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M., Martelli P. (2010b). Serological Characterisation of *Haemophilus parasuis* strains in Italy. Elisabeth grosse Beilage & Thomas Blaha – Field Station of Epidemiology – University of Veterinary Medicine – Hannover, Hannover: 116- 116, In: 2<sup>nd</sup> European Symposium on Porcine Health Management. 26-28 Maggio 2010, Hannover.

8. Mittal K.R., Higgins R., and Lariviera S. (1983). Determination of Antigenic Specificity and Relationship Among *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotypes by an Indirect Hemagglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 17, 787-789.

9. Mittal K.R., Higgins R., and Lariviera S. (1982). Evaluation of slide agglutination and

- ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus parasuis*. J. Clin. Microbiol. 15, 1019-1023.
10. Oliveira S. (2007). *Haemophilus parasuis* diagnostics. J. Swine Health Prod. 15, 99-103.
11. 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.
12. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology 99, 1-12.
13. Olvera A., Ballester M., Nofrarias M., Sibila M., Aragon V. (2009). Differences in Phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. Vet. Res. 40, 24.
14. Raffee M., Blackall P.J. (2000). Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet. J. 78, 172-174.
15. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res. 53, 659-664.
16. Rapp-Gabrielson V.J., Oliveira S., Pijoan C. (2006). *Haemophilus parasuis* in "Diseases of Swine", Blackwell Publishing. 9<sup>th</sup> edition, 681-690.
17. Raßbach A. (1992). Biochemical and serological typing of *Haemophilus parasuis*. Monatsh Veterinaarmed 47, 637-641.
18. Rúbies 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.
19. Solano G.I., Bautista E., Molitor T.W., Segales J., Pijoan C. (1998). Effect of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection on the Clearance of *Haemophilus parasuis* by Porcine Alveolar Macrophages. Can. J. Vet. Res. 62, 251-256.
20. Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottscalk M. (2004). Development of a New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. Journal of Clinical Microbiology 422, 839-840.
21. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology 106, 145-151.

# PREVALENZA E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PCV2 IN CINGHIALI ABBATTUTI IN PROVINCIA DI REGGIO EMILIA

## *PCV2 OCCURENCE AND GENETIC CHARACTERISATION IN HUNTED WILD BOARS IN REGGIO EMILIA PROVINCE*

MAIOLI G.<sup>1</sup>, CORRADINI C.<sup>2</sup>, BONILAURI P.<sup>1</sup>, DOTTORI M.<sup>1</sup>, CANELLI E.<sup>1</sup>,  
CANTONI A.M.<sup>3</sup>, FONTANA R.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>

*1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna*

*2- Veterinario Libero Professionista*

*3-Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria*

**Parole chiave:** Circovirus suino tipo 2 (PCV2), cinghiale, epidemiologia

**Key words:** Porcine circovirus 2 (PCV2), wild boar, epidemiology

**Riassunto:** Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è l'agente eziologico della sindrome multisistemica del deperimento post-svezzamento del suino (Post Weaning Multisystemic wasting syndrome, PMWS). In questo studio, è stata valutata, mediante PCR, la prevalenza dell'infezione da PCV2 in campioni di milza di cinghiali abbattuti nelle aree collinari e di montagna della provincia di Reggio Emilia.

L'indagine tramite Real Time PCR per PCV2, ha fornito risultati positivi in 3 animali su 70 campionati (4,3%), da cui è stato isolato il virus e caratterizzato geneticamente. Tutti i campioni positivi sono stati prelevati nel comune di Castelnovo ne' Monti in cui si osserva la più alta densità di allevamenti di suini. In seguito ad inoculazione su coltura cellulare il virus è stato isolato e successivamente genotipizzato come PCV2b, sporadico negli allevamenti di suini fino al 2004 e prevalente dopo questo periodo. Questo dato rafforza l'ipotesi di un possibile legame epidemiologico fra i cinghiali ed i suini domestici che vivono nello stesso territorio.

Futuri studi in questa direzione, associati ad indagini filogenetiche che permettano di valutare l'analogia tra ceppi virali circolanti nei suini domestici e quelli isolati nel cinghiale, saranno necessari per una migliore comprensione del ruolo che svolge il cinghiale nell'epidemiologia della malattia.

**Abstract:** Porcine circovirus 2 (PCV2) is the causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The present study evaluated the presence of PCV2 in wild boar hunted in hilly and mountain areas from Reggio Emilia province. PCV2 DNA was found in 3 of 70 (4,3%) animals sampled. The virus was isolated from spleen of a positive animal and then characterized as PCV2 type b, sporadically found in pig herds since 2004 and now recognized as the predominant genotype of PCV2 worldwide. Positive animals were sampled where the domestic pig population is higher, suggesting a possible exchange of PCV2 between domestic pigs and wild boars. Further studies, focused on PCV2 genetic variability, will provide a better understanding about the role of wild boar in PCV2 epidemiology.

### INTRODUZIONE

Il Circovirus Suino Tipo 2 (PCV2) è considerato l'agente causale della Sindrome da Deperimento Multisistemico Post-svezzamento (PMWS)(Allan et al, 1999) e di altre forme patologiche che vengono oggi raggruppate, con il termine di "Patologie da Circovirus Suino" (PCVD), come la Sindrome Dermatite-nefrite (PDNS), patologie respiratorie, enteriti e disordini riproduttivi (Segalès et al., 2005)

La PMWS, tra le cosiddette PCVD è quella che presenta il maggiore impatto economico, con un costo annuo per la suinocoltura Europea stimato in circa 600 milioni di euro. Il PCV2 infetta i suidi che sono gli ospiti naturali, mentre le specie animali diverse da questi ultimi non sarebbero sensibili all'infezione (Segalés e Domingo 2002).

La PMWS colpisce prevalentemente suini di 5-15 settimane d'età e la sintomatologia è caratterizzata da un aumento della mortalità, da deperimento, da quadri di linfadenomegalia generalizzata, da patologia respiratoria ed occasionalmente da pallore della carcassa, ittero e diarrea. La diagnosi di PMWS è storicamente supportata dall'interpretazione dei sintomi clinici ed anatomopatologici, peraltro non patognomonic, e si completa con la valutazione dei quadri istopatologici linfonodali e con la quantificazione, attraverso metodi biotecnologici, del DNA dell'agente eziologico.

L'infezione da PCV2 nel cinghiale (*Sus scrofa*) è stata ampiamente dimostrata in studi eseguiti in Spagna (Vicente et al., 2004), Germania (Knell et al., 2005), Ungheria (Csagola et al., 2006) e Italia (Pettrini et al., 2008), basati sulla ricerca del DNA o dell'antigene virale rispettivamente tramite PCR e immunistochimica (IHC).

Indagini sierologiche condotte in Europa per evidenziare la presenza di anticorpi anti-PCV2 in campioni di sangue di cinghiale, hanno dimostrato elevate prevalenze in Belgio (Sanchez et al., 2001), Spagna (Vicente et al., 2004, Ruiz-Fons et al., 2006) e Repubblica Ceca (Sedlak et al., 2008).

Da un punto di vista genetico esiste una certa variabilità tra ceppi di PCV2 isolati in diverse aree geografiche (Fenaux et al., 2000), senza che esista una correlazione tra la sequenza genetica e la patogenicità del virus (Dupont et al. 2008).

Recentemente, per uniformare la nomenclatura relativa ai genotipi di PCV2 il "Consorzio Europeo sulla PCVD" ha proposto una nomenclatura unificata. E' stata pertanto suggerita la suddivisione in 3 genotipi, PCV2a, PCV2b e PCV2c, sulla base della differenza genetica ottenuta dalla comparazione delle sequenze dell'ORF2 virale. In questo contesto il genotipo PCV2a è stato prevalente nella popolazione suina mondiale fino al 2003 ed è stato successivamente soppiantato dal genotipo PCV2b, che tutt'ora appare quello prevalente (Guo et al., 2010).

Da un punto di vista epidemiologico il ruolo del cinghiale non è ancora stato chiarito; diversi lavori scientifici basati sull'analisi filogenetica dell'ORF2 di ceppi di PCV2 isolati nel cinghiale e nel suino domestico hanno evidenziato omologie prossime al 100% (Knell et al., 2005-Csagola et al., 2006) mentre recentemente, in un lavoro basato sul sequenziamento dell'ORF2 e dell'ORF3 di ceppi di PCV2, è stata dimostrata una netta differenza genetica, tra ceppi isolati dal cinghiale e dal suino (Reiner et al., 2010).

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

- valutare la prevalenza dell'infezione da PCV2 nel cinghiale nel territorio della provincia di Reggio Emilia;
- valutare il genotipo di PCV2 circolante e confrontare questo dato con le informazioni raccolte da altri lavori scientifici su questo argomento;
- valutare una possibile relazione epidemiologica tra la presenza di PCV2 nel cinghiale, la diffusione di quest'ultimo e la presenza di allevamenti suinicoli sul territorio.

## **MATERIALI E METODI**

### *Il Campionamento*

Durante la stagione venatoria 2009-2010 sono stati prelevati 70 campioni di milza da altrettanti cinghiali abbattuti all'interno di due Ambiti Territoriali di Caccia ATC (3 e 4), comprendenti 5 comuni (Baiso, Castellarano, Castelnovo ne'Monti, Viano, Villa Minozzo) della zona collinare e montana della provincia di Reggio Emilia. Il campionamento è stato eseguito grazie alla collaborazione dei cacciatori di due squadre di caccia in braccata, esercitanti l'attività venatoria nella zona di montagna (ATC4), di un gruppo di caccia al cinghiale in girata che svolge la sua attività nella zona di collina (ATC3), di un' Azienda Faunistico-Venatoria sita sempre nel territorio

collinare. Inoltre grazie all'attività delle guardie provinciali della Unità Operativa vigilanza caccia e pesca della provincia di Reggio Emilia, sono stati conferiti campioni provenienti da cinghiali abbattuti durante l'attività di controllo della popolazione avvenuta in due distinte aree site nella zona collinare della provincia di Reggio Emilia.

La scelta della milza come organo da prelevare, come avvenuto già in altri studi (Kneil 2005), dipende dal fatto che come tutti gli organi linfoidi è un tessuto bersaglio per il PCV2 ed è facilmente prelevabile direttamente dai cacciatori al momento dell'eviscerazione degli animali abbattuti.

Per quanto riguarda il campionamento, sono stati forniti alle squadre di caccia contenitori in plastica nei quali si richiedeva di riporre al momento dell'eviscerazione porzioni di milza di circa 8 cm, da refrigerare immediatamente.

Per ogni cinghiale abbattuto da cui è stata campionata la milza, è stata registrato il peso e la classe di età.

I campioni di milza sono stati successivamente congelati entro 24 ore dal prelievo e consegnati alla sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

#### *Indagini di laboratorio*

Per verificare la presenza di PCV2 nei campioni prelevati è stata utilizzata una PCR quantitativa seguendo il metodo indicato da Olvera et al. (2004).

I campioni di milza sono stati identificati ed esaminati in pool da 5, per un totale di 14 pool. In caso di riscontro positivo, ogni campione costituente il pool positivo è stato analizzato singolarmente.

I campioni risultati positivi sono stati inviati al reparto di Virologia e Sierologia Specializzata (IZSLER) per l'isolamento virale. Per quest'ultimo scopo il campione di tessuto è stato omogenato ed inoculato, nella misura di 200 µl, in colture cellulari di NLPK PCV-free (rene suino) cresciute in bottigliette da 25 ml. Le colture cellulari sono state incubate a 37°C in termostato a CO<sub>2</sub> per 5 giorni, al termine dei quali è stata eseguita una tripsinizzazione del substrato, sono stati prelevati 200 µl di sovrinatante e su questi eseguita l'ELISA con l'impiego di anticorpi monoclonali specifici per PCV2 (3B11; 4H8; 2A11) prodotti presso il reparto di Virologia e Sierologia Specializzata. In caso di esito negativo, 200 µl di sovrinatante sono stati utilizzati per ulteriori due passaggi prima di considerare la prova negativa.

In caso di isolamento virale è stata eseguita una prova di genotipizzazione, impiegando una metodica modificata rispetto a quella proposta da Horlen et al., 2007, che ha previsto l'estrazione totale del DNA virale e l'esecuzione di una PCR con l'impiego di primer per ORF2, in grado di differenziare i genotipi PCV2a e PCV2b (tabella 1). Il genotipo PCV2c non è stato preso in considerazione a causa della sua scarsa diffusione, in quanto descritto solo in Danimarca in campioni di siero prelevati da animali senza sintomatologia tra il 1980 e il 1990 (Dupont et al., 2008).

Primer reverse PCV2a	GGGGGACCAACAAAAATCTC
Primer forward PCV2	CAGTTCGTCACC
Primer reverse PCV2b	GGGGCTAAACCCCGCTC

**Tabella 1-** *Primer impiegati nella metodica PCR per la distinzione dei due sottotipi (Horlen et al., 2007).*

**Table 1-** *Primers used for the PCV2a and PCV2b differentiation*

#### *Valutazione quantitativa delle popolazioni di cinghiale e suino domestico*

Il cinghiale è un ungulato che normalmente non viene censito nella nostra regione e quindi la densità relativa è stata stimata sulla base del numero di abbattimenti effettuati nel 2009. Le consistenze dei suini domestici e degli allevamenti sono stati ricavati consultando la banca dati dell'Unità Operativa Vigilanza Caccia e Pesca della provincia di Reggio Emilia e l'Anagrafe nazionale zootecnica della Banca Dati Nazionali (BDN).

## RISULTATI

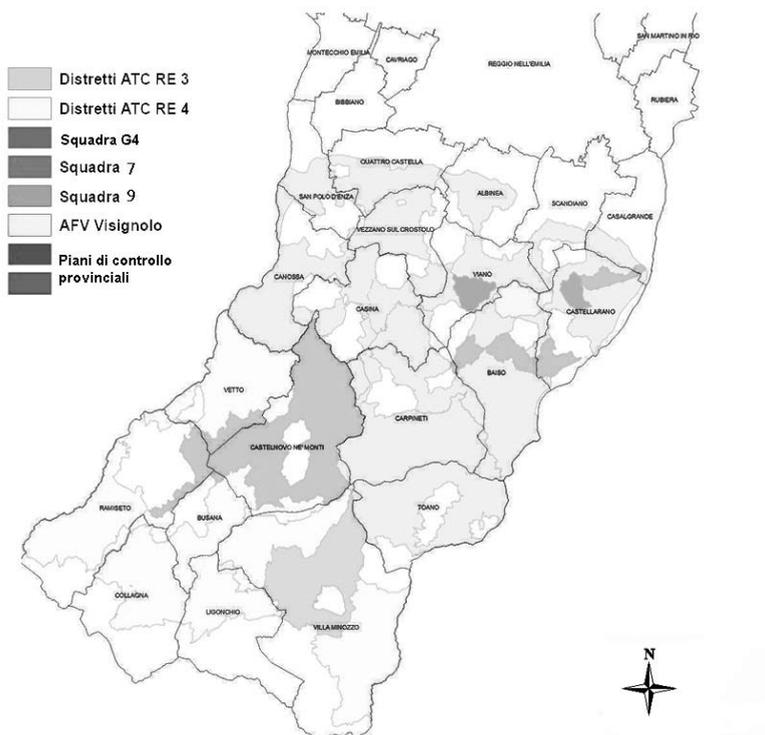
### *Il campionamento*

I risultati del campionamento, che ha portato al prelievo di 70 campioni di milza da altrettanti cinghiali abbattuti sono riportati in tabella 2 e figura 1.

Comune	Dati N° cinghiali	Peso (Kg)			classe di età (mesi)			
		Min	Max	Media	0-6	6-12	12-18	>18
Baiso	7	25	90	55			3	4
Castellarano	7	65	120	82.8				7
Castelnovo ne Monti	21	35	120	56.9			13	8
Viano	10	8	100	42.2	1		7	2
Villa Minozzo	25	25	90	48		6	11	8
<b>Totale</b>	<b>70</b>	<b>8</b>	<b>120</b>	<b>54</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>34</b>	<b>29</b>

**Tabella 2-** *Dati relativi ai settanta campioni prelevati: provenienza, peso minimo, medio, massimo e classi di età degli animali*

**Table 2-** *Data on provenance, weight (minimum, maximum and mean) and age classes of animal sampled*



**Figura 1-** *Aree oggetto del campionamento*

**Figure 1-** *Sampled areas*

### *Indagini di laboratorio*

L'indagine tramite Real Time PCR per PCV2, ha fornito risultati negativi in 12 pool su 14. La presenza di PCV2 è stata evidenziata, con un numero di copie di ac. nucleico virale/gr di milza pari a  $1,3 \times 10^7$  e  $1,5 \times 10^7$ , rispettivamente nei pool 9 e 10. L'indagine sui singoli campioni costituenti il pool ha messo in evidenza la presenza di un cinghiale positivo nel pool C9 (campione n°41) con  $4,1 \times 10^5$  copie di ac. nucleico virale/gr di campione e di due cinghiali positivi nel pool C10 (campioni n° 43 e 45) con  $2,8 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^7$  copie di ac. nucleico virale/gr di campione rispettivamente. Tutti i campioni positivi sono stati prelevati nel comune di Castelnovo ne' Monti.

In seguito ad inoculazione su coltura cellulare del tessuto splenico risultato positivo in real Time PCR, è stato ottenuto l'isolamento di PCV2 dal campione n° 45. L'isolamento è stato confermato tramite l'impiego di una metodica immunoenzimatica (ELISA virologica) basata sull'utilizzo di anticorpi monoclonali. Il virus isolato è stato successivamente genotipizzato come PCV2b.

### *Valutazione quantitativa delle popolazioni di cinghiale e suino domestico*

La stima della densità relativa dei cinghiali sul territorio oggetto dello studio, eseguita come accennato sul numero di animali abbattuti nella stagione di caccia precedente, ha permesso di ipotizzare una densità di cinghiali più bassa nel comune di Villa Minozzo rispetto a quella del comune di Castelnovo ne Monti poiché nel 2009 sono stati abbattuti rispettivamente 67 e 157 animali. I due comuni sopraccitati, dove hanno operato le squadre n°7 e n°9, occupano una parte dell'area localizzata nella zona sud della provincia di Reggio Emilia (figura 1). Le aree di caccia nelle quali operano le due squadre hanno caratteristiche ambientali ottimali per quanto riguarda la diffusione dei cinghiali per la presenza di ampie aree boschive.

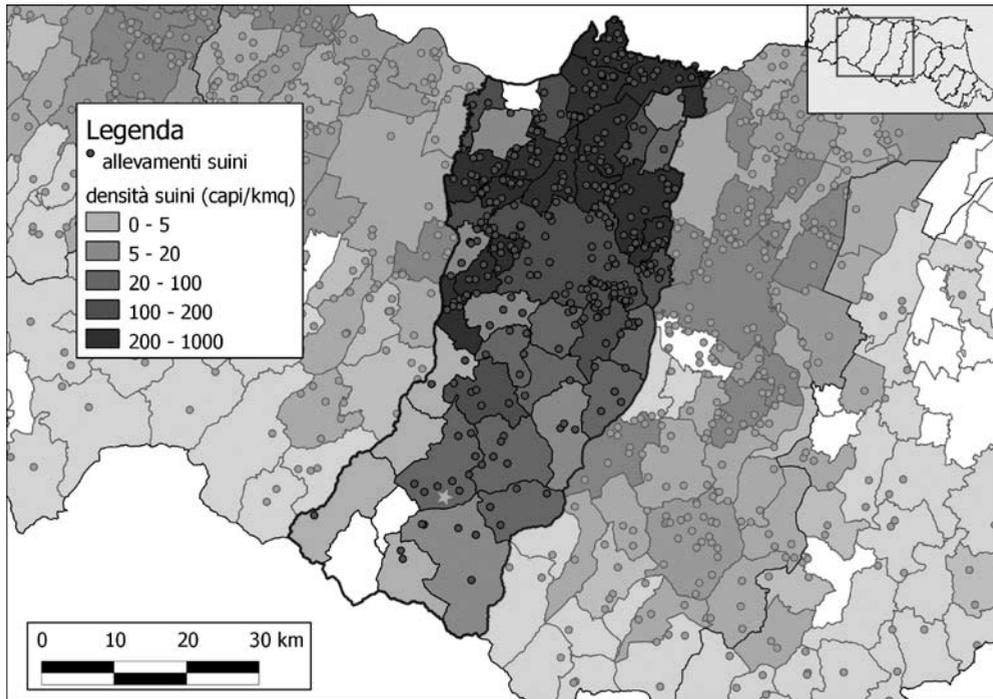
I comuni di Castellarano, Viano e Baiso, dove la densità di cinghiali è decisamente inferiore rispetto ai comuni di Villa Minozzo e Castelnovo ne Monti, sono caratterizzati da ambienti di media-bassa collina, discretamente antropizzati, con un habitat poco favorevole per la diffusione della popolazione di cinghiali, in quanto gran parte del territorio risulta coltivato a foraggi per l'alimentazione delle vacche da latte.

La presenza degli allevamenti suinicoli nel territorio oggetto dello studio è prevalentemente rappresentata da piccoli allevamenti da ingrasso annessi ai caseifici e di conseguenza rispecchiano la distribuzione degli allevamenti bovini destinati alla produzione del parmigiano reggiano. Questo tipo di allevamento sia per motivi demografici, ma soprattutto per caratteristiche orografiche del territorio, risulta essere molto più presente nel comune di Castelnovo ne' Monti (Tabella 3).

Comuni	Consistenze capi suini domestici	n° Allevamenti suini
Baiso	1297	6
Castellarano	4000	5
Castelnovo ne Monti	5248	13
Viano	1985	3
Villa Minozzo	1224	5

**Tabella 3-** *Consistenza al 31 Dicembre 2009 degli allevamenti e dei capi suini nei diversi comuni dove sono avvenuti gli abbattimenti dei cinghiali*

**Table 3-** *Consistency of pigs and herds (31 December 2009) in municipalities of the sampled wild boar*



**Figura 2-** *Densità di suini in provincia di Reggio Emilia, distribuzione degli allevamenti nelle aree di studio e cinghiali positivi per PCV2 (stella gialla)*

**Figure 2-** *Swine density in the Reggio Emilia province, herds distribution and PCV2 positive wild boars (yellow star)*

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di PCV2 nella popolazione di cinghiali della zona collinare e montuosa della provincia di Reggio Emilia sebbene con una prevalenza decisamente bassa (4,3%) se confrontata con i risultati di altri studi di questo tipo eseguiti in Europa (Vicente 2004, Knell 2005, Csagola 2005).

La bassa prevalenza riscontrata può essere ricondotta a diversi fattori: tipologia di campionamento, caratteristiche del territorio in cui è stato eseguito lo studio e fattori di natura epidemiologica. Per quanto riguarda la tipologia di campionamento è fondamentale ricordare come lo studio riportato si basi su animali cacciati e per i quali non è possibile stabilire se fossero presenti quadri clinici ed anatomopatologici riconducibili a PMWS. Oltre a questo è necessario sottolineare come il 90% degli animali campionati avesse un'età superiore a 12 mesi e che il 41% del totale fosse oltre i 18 mesi d'età (Tabella 2). Quest'ultimo aspetto potrebbe aver influenzato il dato di prevalenza riportato, considerando che generalmente l'infezione da PCV2 ed i casi di PMWS nel cinghiale sono descritti con maggior frequenza tra 4 e 10 mesi (Ruiz-Fons et al, 2008).

La presenza di PCV2 è stato evidenziata nei cinghiali abbattuti in una sola area di caccia (comune di Castelnovo ne' Monti), caratterizzata da una elevata concentrazione di cinghiali e con la più alta densità di suini fra i comuni inseriti nello studio. Questi fattori sono sicuramente determinanti per favorire l'eventuale passaggio di PCV2 dall'ambiente domestico a quello selvatico ed influenzano con ogni probabilità il livello di prevalenza dell'infezione nel

cinghiale. A questo proposito, infatti, se il cinghiale può essere considerato il potenziale reservoir di virus come il pestivirus della Peste suina classica o l'herpesvirus della malattia di Aujeszky per il suino domestico, questo non è applicabile per il PCV2. Per il PCV2, infatti viene considerato più probabile il ruolo del suino domestico come fonte d'infezione per il cinghiale (Vincente et al., 2004).

Il virus isolato nei cinghiali nel presente lavoro appartiene al genotipo PCV2b, sporadico negli allevamenti di suini fino al 2004 e prevalente dopo questo periodo. Questo dato, già segnalato in altri lavori scientifici su questo argomento (Toplak et al, 2004, Reiner et al, 2010-a), rafforza l'ipotesi di un possibile legame epidemiologico fra i cinghiali ed i suini domestici che vivono nello stesso territorio.

Secondo altri autori, tuttavia, sarebbe ipotizzabile una certa indipendenza dei ceppi circolanti nel cinghiale e nel suino, senza possibilità di infezioni crociate, per le scarse possibilità di contatto tra le due specie. Anche la modalità di trasmissione del PCV2 che avviene principalmente per contatto diretto rafforzerebbe questa ipotesi (Reiner et al., 2010).

Infine la bassa prevalenza riscontrata nel presente lavoro, confrontata con studi analoghi in Europa (Vicente 2004, Knell 2005, Csagola 2005), potrebbe essere ricondotta agli effetti dell'introduzione della vaccinazione per PCV2 negli allevamenti suini. L'impiego della vaccinazione infatti, oltre ai benefici effetti sanitari nell'allevamento suino, determina una riduzione della circolazione virale all'interno degli allevamenti stessi, con possibili ripercussioni anche sulla circolazione di PCV2 nei cinghiali.

Futuri studi in questa direzione, associati ad indagini filogenetiche che permettano di valutare l'omologia tra ceppi virali circolanti nei suini domestici e quelli isolati nel cinghiale, saranno necessari per una migliore comprensione del ruolo che svolge il cinghiale nell'epidemiologia della malattia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Allan GM, Ellis JA. (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* Jan;12(1):3-14.
2. Allan GM, Mc Neilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Bøtner A, Charreyre CE. (1999) Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* Apr 1;66(2):115-23.
3. Cságola A, S. Kecskeméti, G. Kardos, I. Kiss and T. Tuboly, (2006): Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boar, *Archives of Virology* 151, pp. 495–507
4. Dupont K, Nielsen EO, Bakbo P, Bækbo P, Larsen LE: Genetic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008, 128:56-64.
5. Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ: Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of Northern America and development of a differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 2000, 38:2494-2503.
6. Guo et al.: (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 7:273
7. Horlen KP, Schneider P, Anderson J, et al. (2007): A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health Prod.*;15(5):270–278
8. Knell S., Willems H., Hertampf B., Reiner (2005). Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Vet Microbiol* Aug 30; 109(3-4):169-177

9. 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*. Apr;117(1):75-80.
10. Petrini S., Gavaudan S, Barrocci S, Briscolini S, Sebastiani C., Mancini P, Paniccià M, Villa R, Ferrari M (2008) Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di circovirus suino tipo 2(PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia. *Atti della soc. italiana di patologia ed allevamento dei suini- Salsomaggiore Terme(PR)*
11. Reiner, G., Bronnert, S., Hohloch, C., Fresen, C., Haak, I., Willems, H., Reinacher, M. (2010): Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet. Microbiol.* 145, 1–8
12. Reiner G, Bronnert B, Hohloch C, Reinacher M, Willems H. Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol.* 2010 Aug 26.
13. Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V., Gortazar, C., (2006): Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731–743
14. Sanchez, R., Nauwynck, H.J., Pensaert, M., (2001) : Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: *Proceedings of the Eur. Soc. Vet. Virol., St. Malo, France*, p. 122.
15. Sedlak, K., Bartova, E., Machova, J., (2008): Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J. Wildl. Dis.* 44,777–780.
16. Segales J., Domingo M. (2002): Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pig. *A review Vet Q* 24: 109 124
17. Segalès, J., Allan ,G. M., Domingo,M., (2005): Porcine circovirus diseases. *Anim. HealthRes.Rev.*6,119–142.
18. Toplak I, Grom J, Hostnik P, Barlic-Maganja D. (2004): Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet Rec.* Aug 7;155(6):178-80.
19. Vicente, J.,Segalés, J.,Hofle,U.,Balasch,M.,Plana-Duran,J.,Domingo,M., Gortazar, C., (2004): Epidemiological study on porcine circovirustype2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*).*Vet.Res.*35, 243–253.

# EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE PER CIRCOVIRUS IN ALLEVAMENTO CON CIRCOLAZIONE VIRALE, MA CON ASSENZA DI CASI DI PMWS

## *EFFECTIVENESS OF CIRCOVIRUS VACCINATION IN A PCV2 POSITIVE HERD IN ABSENCE OF PMWS CASES*

SCHIAVON E.<sup>1</sup>, RAMPIN F.<sup>1</sup>, BORTOLETTO G.<sup>2</sup>, LEOTTI G.<sup>3</sup>, TONON F.<sup>4</sup>, IOB L.<sup>1</sup>, DRIGO M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD); <sup>2</sup>Dipartimento Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria Università di Padova; <sup>3</sup>Meril Italia; <sup>4</sup>Libero Professionista

**Parole chiave:** vaccinazione, PCV2, suino, PCVD, PMWS

**Key words:** vaccination, PCV2, pig, PCVAD, PMWS

**Riassunto.** Il Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) è l'agente primario di una serie di sindromi che prendono il nome di PCVAD tra cui le patologie respiratorie, le sindromi riproduttive e la sindrome multisistemica del deperimento post svezzamento (PMWS) che crea i maggiori danni economici. Il lavoro ha lo scopo di analizzare gli eventuali benefici prodotti dalla vaccinazione per PCV2 tramite vaccinazione delle scrofe, in un allevamento PCV2 positivo e assenza di PCVAD. Lo studio è stato eseguito in un'azienda a ciclo chiuso organizzato in bande trisettimanali. Tre gruppi di scrofe sono state sottoposte a vaccinazione mentre altre tre bande non sono state sottoposte al trattamento immunizzante. Durante la sperimentazione è stato previsto un monitoraggio sierologico longitudinale in dieci suinetti di madri vaccinate e dieci da non vaccinate per verificarne lo stato immunitario. Il peso medio di 50 suinetti per banda è stato valutato tramite quattro pesate nei diversi momenti produttivi. La mortalità nei diversi gruppi è stata registrata durante tutto il periodo di sperimentazione. Dai risultati ottenuti si rileva un omogeneo trasferimento anticorpale nei suinetti provenienti da madri vaccinate, una riduzione della mortalità nei soggetti prevenienti da madri vaccinate e le performance produttive hanno evidenziato differenze statisticamente significative solamente nella fase ingrasso-macello a favore dei soggetti provenienti da scrofe vaccinate.

**Abstract.** Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the primary agent of PCV associated diseases (PCVAD) as respiratory diseases, reproductive syndromes and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) that produces the greatest economic losses. The aim of this work was to investigate the possible benefit of sows vaccination against PCV2 in a PCV2 positive, PMWS negative herd (absence of PCVAD). The study was conducted in a farrow-to-finish farm using a 3-week farrowing batch management. Three groups of sows were vaccinated with a commercially available PCV2 vaccine, three groups were not vaccinated. Ten pigs from vaccinated and other ten from non-vaccinated dams were randomly selected and sampled weekly with blood testing for PCV2 and PRRS viruses, PCV2 and PRRS antibodies. A sample of pigs from each batch was weighted four times from weaning to slaughtering to investigate the productive performances. Mortality rates between vaccinated and non-vaccinated batches were analyzed. Vaccinated group showed a better maternal immunity transfer and significant lower mortality rates. At fattening and slaughtering significant better productive performances were recorded in pigs from vaccinated dams.

## INTRODUZIONE

Il Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) appartiene alla famiglia delle *Circoviridae* e genere *Circovirus*, è il più piccolo virus a DNA conosciuto, di diametro di circa 17 nm e non presenta envelope.

Nell'ambito delle patologie da Circovirus del suino (PCVD), la sindrome multisistemica del deperimento post svezzamento (PMWS) è tra le patologie che creano i maggiori danni economici. Segnalata per la prima volta in Canada nel 1996 si è poi diffusa nel continente asiatico, nord e sud americano ed europeo. Anche in Italia molte sono le segnalazioni relative alla presenza e alla circolazione del virus PCV2 e numerosi sono i focolai di PMWS negli allevamenti della Pianura Padana (Schiavon et al., 2008). Questa patologia colpisce gruppi di animali in età post svezzamento tra le 4 e le 24 settimane di età (Segalés et al., 2004) ed in particolare tra le 8 e 12 settimane. I sintomi più comuni sono: deperimento, problemi respiratori, linfadenomegalia, ittero, pallore associato ad anemia, diarrea e scarsa risposta agli interventi terapeutici. L'utilizzo della vaccinazione ha ben controllato la patologia negli allevamenti colpiti da PMWS, ma molte volte si ricorre all'utilizzo dell'immunizzazione anche in allevamenti che pur presentando circolazione virale non presentano segni clinici di PMWS o di sindromi associate a PCV2. Questa pratica ha comportato risultati discordanti e non ben quantificabili. La seguente sperimentazione ha voluto analizzare gli eventuali benefici di una vaccinazione somministrata alle scrofe in un allevamento PCV2 positivo e con assenza di sindromi direttamente associabili a PCV2 tra cui la completa assenza di casi clinici riferibili a PMWS.

## MATERIALE E METODI

L'azienda oggetto di studio è stata un allevamento a ciclo chiuso, composto da 170 scrofe organizzata su bande tri-settimanali costituite da 23-25 scrofe. Tale allevamento è organizzato in due capannoni, uno per la fase riproduzione e l'altro per la fase di ingrasso, tali strutture sono unite da un corridoio coperto con la presenza di una bilancia. L'azienda comprende anche un piccolo mangimificio utilizzato per la composizione e somministrazione dell'alimento.

Le profilassi vaccinali attuate erano le seguenti: vaccinazione per PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Malattia di Aujeszky, Parvoviroso, Mal Rosso. Dai test sierologici effettuati di routine in allevamento è stata evidenziata la circolazione virale di PCV2 con presenza di anticorpi e di viremia in entrambi i capannoni, pur nella costante assenza di sintomi associabili a PCVD.

### Protocollo operativo

Lo studio ha previsto la costituzione di un gruppo di scrofe da vaccinare (esposti) appartenenti alle bande 1, 3 e 5 e la costituzione di un gruppo di scrofe non vaccinate (non esposti) appartenenti alle bande 2, 4 e 6 per la comparazione dei parametri produttivi. E' stata eseguita la vaccinazione secondo lo schema riportato dalla casa madre, vaccinando la banda 40-50 giorni prima del parto e richiamando 20 giorni prima del parto.

Durante la prima settimana di vita sono stati selezionati casualmente 10 suinetti dalla prima banda vaccinata e 10 dalla prima banda non vaccinata ed identificati singolarmente con marca auricolare numerata. Questi soggetti sono stati seguiti tramite prelievi sierologici settimanali per un totale di 13 settimane. Questo ha consentito di monitorare la presenza di anticorpi contro PCV2 e PRRS e la presenza di virus quali PCV2 e PRRSV.

La mortalità dei suinetti nati dalle prime 6 bande è stata registrata come incidenza cumulativa e i soggetti morti sono stati sottoposti a necropsia ed altri accertamenti diagnostici al fine di identificarne la causa di morte.

Inoltre un campione di 50 animali (25 maschi e 25 femmine) di ogni banda è stato marcato (con marca auricolare di gruppo) e pesato in determinati momenti del ciclo produttivo al

fine di evidenziare le performance produttive in termini di peso medio per banda. Le pesate sono state effettuate: allo svezzamento, a 68 giorni quando i suinetti vengono convogliati al reparto magronaggio, a 120 giorni durante la fase di ingrasso e una settimana prima della macellazione.

Inoltre l'azienda è stata monitorata trasversalmente ogni 4 mesi per evidenziare la circolazione di PCV2.

### Metodi statistici

La mortalità tra soggetti di bande vaccinate e non vaccinate è stata confrontata in termini di Mortality Risk Ratio (MRR) e analizzata mediante il test del chi-quadro.

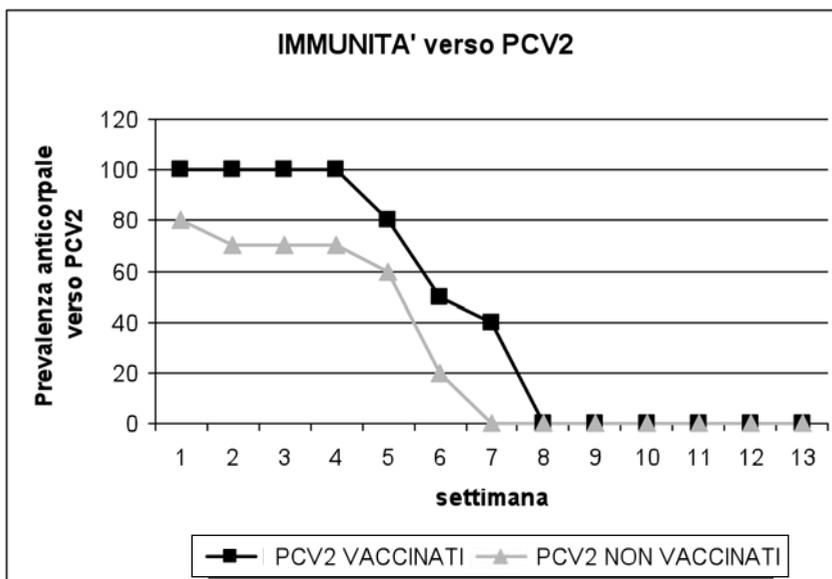
Verificata la normalità dei dati, il peso medio dei soggetti raggruppati per bande vaccinate e non vaccinate, è stato analizzato per ogni momento di pesata tramite t-test per campioni indipendenti. La significatività statistica è stata fissata per un valore di  $P < 0.05$ .

## **RISULTATI**

### Monitoraggio sierologico longitudinale

Nel monitoraggio sierologico dei 10 suinetti per le prime due bande (una vaccinata e una non vaccinata) i test in RT-PCR per PCV2 effettuati in pool di 5 sieri sono sempre risultati negativi, diversamente da PRRSV che è stata evidenziata in entrambe le bande a partire dalla 5° settimana dalla nascita e fino all'11° settimana.

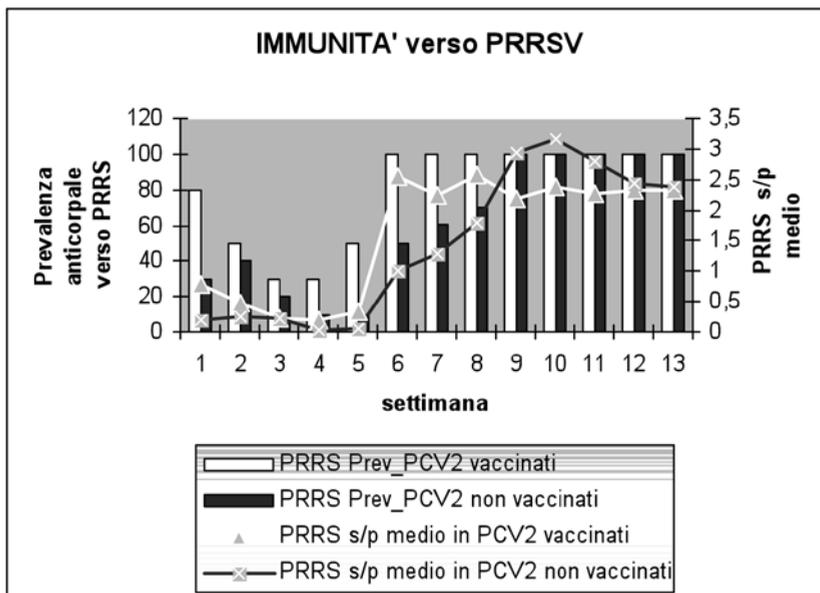
Per quanto concerne l'immunizzazione da PCV2 il gruppo dei suinetti nati da scrofe vaccinate manifesta un miglior trasferimento di anticorpi materni con il 100% dei suinetti positivi per anticorpi contro PCV2 e con un'immunità che tende a protrarsi fino all'8° settimana di vita, mentre i suinetti nati da scrofe non vaccinate manifestano un trasferimento anticorpale inferiore per prevalenza anticorpale (80%) e durata (6-7 settimane) (Fig. 1).



**Fig. 1:** Prevalenza di suinetti con anticorpi per PCV2 nei due gruppi sperimentali

**Fig. 1:** Percentage of piglets with PCV2 antibodies detected in serum in experimental groups

Per quanto concerne l'immunizzazione da PRRS dopo il calo dell'immunità materna (a 4 settimane di età) la risposta immunitaria contro PRRSV è stata più precoce e rapida nei soggetti della banda vaccinata rispetto a quelli della banda non vaccinata sia in termini di prevalenza anticorpale che di valore di s/p medio. Comunque entrambi i gruppi hanno dimostrato alti livelli di immunocompetenza dopo le 9 settimane di vita (Fig. 2).



**Fig. 2:** Prevalenza anticorpale e valore di s/p medio per PRRS nei due gruppi sperimentali  
**Fig. 2:** PRRS antibodies prevalence and mean s/p ratio in the two experimental groups

### Mortalità gruppi

Nel periodo di sperimentazione sono stati sottoposti ad esame autoptico 38 dei 58 soggetti morti (alcuni soggetti non sono stati sottoposti ad analisi per il cattivo stato di conservazione della carcassa o per la mancanza di reperimento da parte degli operatori dell'allevamento). Le carcasse conservate presso la cella frigo dell'allevamento venivano trasportate presso la sezione diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico di Padova dove erano sottoposte ad un esame anatomopatologico con descrizione delle lesioni rilevate, esame batteriologico e virologico collaterali in relazione al quadro patologico riscontrato. Sette carcasse sono pervenute in avanzato stato di putrefazione e quindi non sottoposte ad indagini. Dei 31 soggetti l'80% (25) presentavano forme di pleuropolmonite fibrinosa, pericardite fibrinosa e nella maggior parte dei casi anche lievi peritoniti fibrinose. Gli agenti batterici isolati da polmoni, pericardio, fegato e cervello erano in 16 soggetti *Streptococcus suis* e di questi 5 erano in associazione con *Pasteurella multocida*. Negli altri soggetti sono state riscontrate lesioni quali ulcera gastrica (2), enterite (2), piodermite (1) trauma (1). I soggetti con forme respiratorie sono stati sottoposti a ricerca per PRRSV con esito positivo in tutti i soggetti mentre la presenza di PCV2 è stata riscontrata in quattro soggetti provenienti da bande differenti.

I suinetti nati da scrofe vaccinate hanno avuto una mortalità dal 2,1% al 2,7% mentre i suini provenienti da scrofe non vaccinate hanno manifestato una mortalità di circa il 6% con esclusione della seconda banda in cui si è manifestata una mortalità del 12 %

imputabile a polmoniti e setticemie da *Streptococcus. suis*.

Complessivamente i soggetti appartenenti alle bande vaccinate hanno registrato mortalità significativamente inferiori rispetto a quelle non vaccinate MRR= 0.31 (CI 95% 0.16 – 0.59) (Chi-quadro =15.59; 1 gdl; p<0.0001) (Tab. 1).

**Tab.1:** *Mortalità tra soggetti di bande vaccinate e non vaccinate*

**Tab.1:** *Mortality between vaccinated and non vaccinated groups*

Gruppo	Vivi	Morti (%)	Totale
vaccinati	535	14 (2,5)	549
non vaccinati	519	44 (7,8)	563
totale	1084	58 (5,1)	1142

#### Dati produttivi

Durante il periodo di sperimentazione i soggetti sono stati pesati in quattro momenti: allo svezzamento, a 68 giorni quando i suinetti vengono convogliati al reparto magronaggio, a 120 giorni e ad una settimana prima della macellazione.

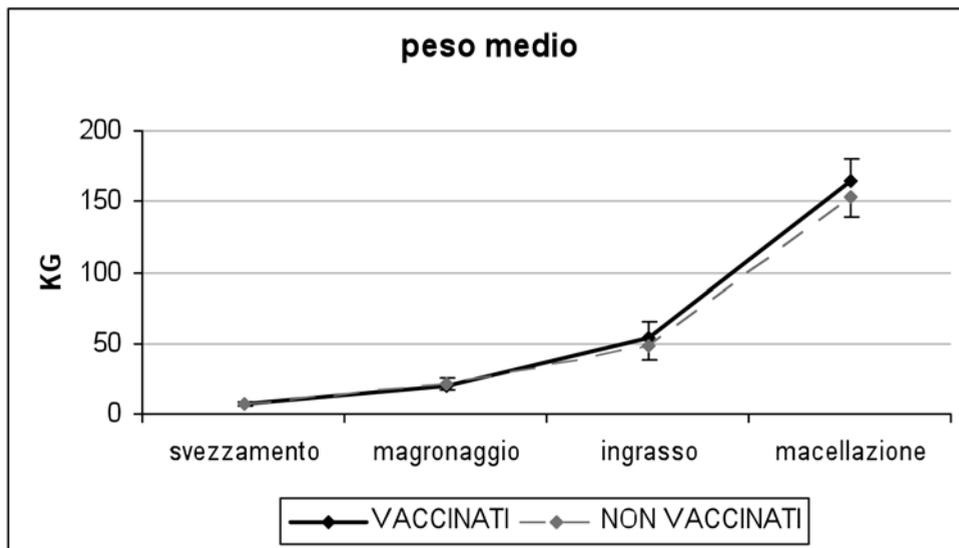
In tabella 2 sono riportati i pesi medi dei soggetti (raggruppati assieme) provenienti da bande vaccinate e da bande non vaccinate per i diversi momenti di pesata. Al momento dello svezzamento e del magronaggio non si sono rilevate differenze statisticamente significative. Al momento dell'ingrasso e della macellazione, invece, i soggetti di madri vaccinate hanno dimostrato pesi medi significativamente superiori rispetto a quelli di madri non vaccinate (Fig.3).

**Tab.2:** *Peso medio tra soggetti di bande vaccinati e non vaccinati per PCV2*

**Tab.2:** *Mean weight between PCV2 vaccinated and non-vaccinated groups*

Momento Pesata	Vaccinati (media±ds)	Non Vaccinati (media±ds)
svezzamento	7.66±1.37	7.55±1.21
magronaggio	20.49±5.34	21.5±4.69
ingrasso*	53.36±11.5	48.7±9.96
macellazione <sup>o</sup>	164.78±15.18	153.13±14.61

\* t=3.48 p<0.001; <sup>o</sup> t=4.23 p<0.000



**Fig.3:** *Peso medio tra soggetti di bande vaccinati e non vaccinati per PCV2*  
**Fig.3:** *Mean weight between PCV2 vaccinated and non-vaccinated groups*

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Molti sono gli studi in cui si vengono ad analizzare le caratteristiche indubbiamente positive delle vaccinazioni contro PCV2 (KwanSooLyo et al., 2010). Questo studio ha voluto dare, con il suo approccio pratico, una risposta all'utilizzo della vaccinazione delle scrofe in allevamenti con circolazione di PCV2 ma senza apparenti quadri clinici di PCVD.

Tale approccio, applicato e studiato per la prima volta in un allevamento italiano è, a nostro avviso, interessante proprio in considerazione della notevole durata del ciclo di ingrasso che caratterizza la nostra tipologia di allevamento. La scelta dell'allevamento a bande, anche se non molto diffuso in Italia ci ha consentito di ridurre i tempi di sperimentazione ed avere quasi in parallelo soggetti esposti e non esposti a vaccinazione contro PCV2.

Dai risultati ottenuti si rilevano indicazioni importanti tra cui l'omogenea e duratura copertura anticorpale derivante dalle madri vaccinate in accordo con i dati bibliografici (Opriessnig et al. 2010). Per quanto concerne i dati di mortalità, questo allevamento ha avuto indubbi vantaggi nell'utilizzo della vaccinazione in quanto si è registrata una notevole riduzione della percentuale di mortalità nei soggetti di madri vaccinate rispetto a quelli nati da madri non vaccinate. Questo aspetto è da ricollegarsi al miglior status sanitario evidenziato nelle bande vaccinate rispetto a quelle non vaccinate.

Le performances produttive, in termini di peso medio tra soggetti vaccinati e non vaccinati, hanno evidenziato differenze significative solamente col progredire dell'età dei soggetti ovvero dal momento della pesata all'ingrasso e alla macellazione. Questi dati, che vanno comunque contestualizzati all'interno di una prova di campo in cui risulta difficile controllare alcuni fattori ambientali (stabilazione, alimentazione, densità animale etc.), vanno interpretati ipotizzando un miglior andamento sanitario dei soggetti di bande vaccinate rispetto alle non vaccinate.

Per poter confermare l'effettiva efficacia della vaccinazione contro PCV2 si dovrebbe aumentare il numero di soggetti sottoposti a sperimentazione, coinvolgendo più allevamenti e soprattutto diverse situazioni manageriali.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Chae C. (2004) Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal*, 168, 41-49.
- KwanSooLyoo, HanSooJoo, Brian Caldwell, Hyeun Bum Kim, Peter R. Davies, Jerry Torrison (2010) Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *The Veterinary Journal* (article in press)
- Opriessnig T., Meng X.J., Halbur P.G. (2007) Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 591-615.
- Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Ramamoorthy S, Meng XJ, Halbur PG. (2010) Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol.* 19;142(3-4):177-83
- Opriessnig T, Madson DM, Prickett JR, Kuhar D, Lunney JK, Elsener J, Halbur PG (2008). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet Microbiol.* 131(1-2):103-14.
- Segalés J., Rosell C., Domingo M. (2004) Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology* 98, 137-149.
- Schiavon E., Vio D., Rampin F., Leotti G., Vascellari M., Mutinelli F. (2008) Presenza di PMWS in allevamenti del Veneto e Friuli Venezia Giulia: risultati preliminari. *Atti SIPAS*:411-417.

# RISULTATI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER LA VALUTAZIONE DEL COINVOLGIMENTO DEL PCV2 NELLA PATOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL SUINO

## ***PRELIMINARY RESULTS OF A DIAGNOSTIC PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF PCV2 INVOLVEMENT IN SWINE REPRODUCTIVE FAILURE***

MORANDI F.<sup>1</sup>, PANARESE S.<sup>1</sup>, MASERATI A.<sup>2</sup>, GRANITO G.<sup>2</sup>, DOTTORI M.<sup>3</sup>,  
BONILAUDI P.<sup>3</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>, LELLI D.<sup>4</sup>, LEOTTI G.<sup>5</sup>,  
BIANCHI M.<sup>5</sup>, BRUNETTI B.<sup>1</sup>, FERRARA D.<sup>1</sup>, BIANCO C.<sup>1</sup>, VILA T.<sup>6</sup>,  
JOISEL F.<sup>6</sup>, OSTANELLO F.<sup>1</sup>, SARLI, G.<sup>1</sup>

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna; Veterinario libero professionista<sup>2</sup>; IZSLER Reggio Emilia<sup>3</sup> e Brescia<sup>4</sup>; Merial Italia<sup>5</sup>; Merial S.A.S., Lione<sup>6</sup>*

**Parole chiave:** PCV2, patologia riproduttiva, protocollo diagnostico.

**Key Words:** PCV2, reproductive failure, diagnostic protocol.

**Riassunto.** Sin dalla prima segnalazione di coinvolgimento di PCV2 in casi di aborto e natimortalità, a causa della bassa carica virale e delle lesioni fetali non sempre rilevanti, è risultato difficile stabilire un protocollo diagnostico per le patologie riproduttive associate al virus. L'obiettivo dello studio è stato quindi quello di testare un protocollo diagnostico da poter applicare ad allevamenti nei quali si sospetti il coinvolgimento di PCV2 nelle patologie della sfera riproduttiva: sui campioni raccolti è stato eseguito un primo test di screening mediante PCR ed i casi positivi sono stati sottoposti ad una tecnica *in situ* (immunoistochimica, IHC). Diagnosi di coinvolgimento di PCV2 nell'evento denunciato è stata data quando ad una PCR positiva si è avuto il riscontro di una positività IHC o presenza di anticorpi anti-PCV2 nel siero. I campioni raccolti provenivano da due aziende (A e B) con problemi riproduttivi. Solo in una azienda l'iter diagnostico è stato conclusivo e completato dall'approccio *in situ* oltre che dal riscontro in due sieri di anticorpi anti-PCV2. Nonostante questo, in entrambi gli allevamenti, dove erano stati esclusi altri importanti patogeni (Aujeszky's disease virus (ADV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), la percentuale di suinetti e/o feti abortiti, mummificati, nati morti o disvitali, si è mostrata, sebbene con valore statisticamente non significativo, più alta nelle nidiate PCR+, rispetto a quelle negative. Alla luce dei risultati ottenuti, l'impiego di tecniche *in situ* quali IHC per la diagnosi di patologia riproduttiva associata a PCV2 non sembrano da sole garantire un sufficiente livello di sensibilità.

**Abstract.** Since the first report of PCV2 involvement in aborted and stillborn foetuses, the low viral load and the inconstant presence of foetal lesions have made it difficult to adopt a suitable diagnostic protocol for reproductive failure associated to PCV2. The aim of this study was to apply a diagnostic protocol to farms with reproductive failures in which the involvement of PCV2 was suspected. In the diagnostic protocol, PCR was the screening test used to select the cases for further investigation by *in situ* technique (immunohistochemistry, IHC). The role as pathogen of PCV2 in an episode of reproductive failure was defined when PCR positivity was assessed in addition to either IHC positivity or presence of PCV2 antibodies in the serum. Two farms (A and B) with reproductive failures were sampled, but in only one the diagnostic protocol was successfully completed by the *in situ* techniques

and the finding of antibodies against-PCV2 in two sera. In both farms, where other important pathogens (Aujeszky's disease virus (ADV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can be excluded, the percentages of aborted, mummified, stillborn or weak-born piglets/foetuses, showed a higher trend in PCR+ than in PCR- litters. However, according to the results obtained, *in situ* techniques such as IHC for the diagnosis of PCV2 reproductive failure do not seem to guarantee a suitable level of sensitivity.

## INTRODUZIONE

A partire dal 1998 quando il circovirus suino tipo 2 (PCV2) fu associato alla sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS), il suo coinvolgimento è stato riconosciuto in numerose altre forme patologiche del suino, tutte identificate con l'acronimo PCVD (*porcine circovirus diseases*) (Chae, 2005; Segalés *et al.*, 2005). Successivamente, il PCV2 è stato dimostrato essere coinvolto anche in patologie della sfera riproduttiva (West *et al.*, 1999; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2004). L'ampia diffusione dell'infezione e l'assenza di un rapporto diretto causa-effetto fra presenza del virus e manifestazioni patologiche, ha elevato i test *in situ* (immunoistochimica - IHC - e ibridazione *in situ* - ISH - ) che permettono di dimostrare la presenza del virus nel contesto delle lesioni istologiche (Brunborg *et al.*, 2004), a *gold standard* nella diagnosi delle PCVD (Segalés *et al.*, 2005). Questo aspetto ha permesso così di operare utilizzando protocolli diagnostici puntuali ed efficaci (Sarli *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2005; Sorden, 2000). Al contrario, per quanto riguarda le patologie riproduttive associate a PCV2 la carica virale e le lesioni fetali non sono sempre elevate ed evidenti (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007) e addirittura assenti nella scrofa. Tale aspetto può rendere la diagnosi difficoltosa. Inoltre, a complicare maggiormente un possibile approccio diagnostico è la probabile presenza ambientale di PCV2 che obbliga a porre particolare attenzione alla modalità di prelievo dei campioni ed alla interpretazione di risultati positivi ai test d'indagine biomolecolare. In tale situazione, quindi, sembra essere la combinazione di più tecniche (IHC o ISH, RT-PCR e ricerca anticorpale nel siero) associata ad una scrupolosa modalità di prelievo dei campioni, a dare informazioni utili al complesso iter diagnostico della patologia riproduttiva associata a PCV2.

Lo scopo del presente lavoro è quello di presentare i risultati preliminari di un percorso per l'elaborazione di un protocollo diagnostico per un'azienda o per un veterinario aziendale che sospettino o vogliano indagare il coinvolgimento del PCV2 in problemi riproduttivi denunciati od osservati.

## MATERIALI E METODI

### *Casistica*

Presso il servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna sono stati conferiti complessivamente 91 suinetti e/o feti abortiti, mummificati, nati morti o disvitali (AMMD), appartenenti a due aziende (A e B) che denunciavano problemi riproduttivi (AMMD, ritorni in estro) e per i quali erano già state indagate altre cause infettive e non infettive responsabili del quadro denunciato. In particolare la casistica (tab. 1) è suddivisa come segue: 1) l'azienda A da 15 nidiatae costituite da 213 suinetti, ha raccolto e conferito presso la Sezione 66 AMMD, complessivamente il 31% del totale partorito con le 15 nidiatae; 2) l'azienda B, da 6 nidiatae costituite da 74 suinetti, ha conferito 25 AMMD, il 33,8% del totale partorito con le 6 nidiatae.

### *Necropsia e prelievo dei campioni*

Tutti gli AMMD sono stati sottoposti a necropsia e relativamente alle condizioni di conservazione e disidratazione, in particolare dei soggetti mummificati, sono stati

costantemente campionati: il fegato, la milza, il cuore ed i linfonodi inguinali superficiali dei quali una parte veniva fissata in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina ed una parte congelata a -20°C. Inoltre, dai soggetti in buono e discreto stato di conservazione, aprendo il torace, è stato fatto prima di ogni altra manualità un prelievo del sangue contenuto nella vena cava caudale con siringa sterile.

Azienda	numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	Nidiate esaminate	Nidiate PCR positive**	Suinetti AMMD/nidiate PCR+	Suinetti AMMD/nidiate PCR-
A	14 (21,2%)	15	7 (46,7%)	35,2%	23,5%
B	11 (44,0%)	6	4 (66,7%)	32,1%	22,2%

**Tabella 1.** Risultati della PCR: \*Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; \*\*una nidiate è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+.

**Table 1.** PCR results: \*Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; \*\*a litter is considered PCR+ when at least one piglet is PCR+.

Azienda	numero di suinetti AMMD* positivi a PCV2 in PCR	nidiate “problema”	Nidiate “problema” PCR positive**	Suinetti AMMD/nidiate PCR+	Suinetti AMMD/nidiate PCR-
A	10 (18,18%)	10	5 (50%)	44,2%	30,1%
B	11 (47,82%)	5	4 (80%)	32,1%	0***

**Tabella 2.** Risultati della PCR considerando solo le “nidiate problema” (aborto o nidiate con più di 4-5 MMD): \*Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; \*\*una nidiate è considerata PCR+ se almeno un AMMD risulta PCR+; \*\*\*mancano le nidiate problema risultate PCR-

**Table 2.** PCR results considering only the target litters (aborts or litter with more than 4-5 MMD): \*Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; \*\*a litter is considered PCR+ when at least one piglet is PCR+; \*\*\*none PCR-target litter.

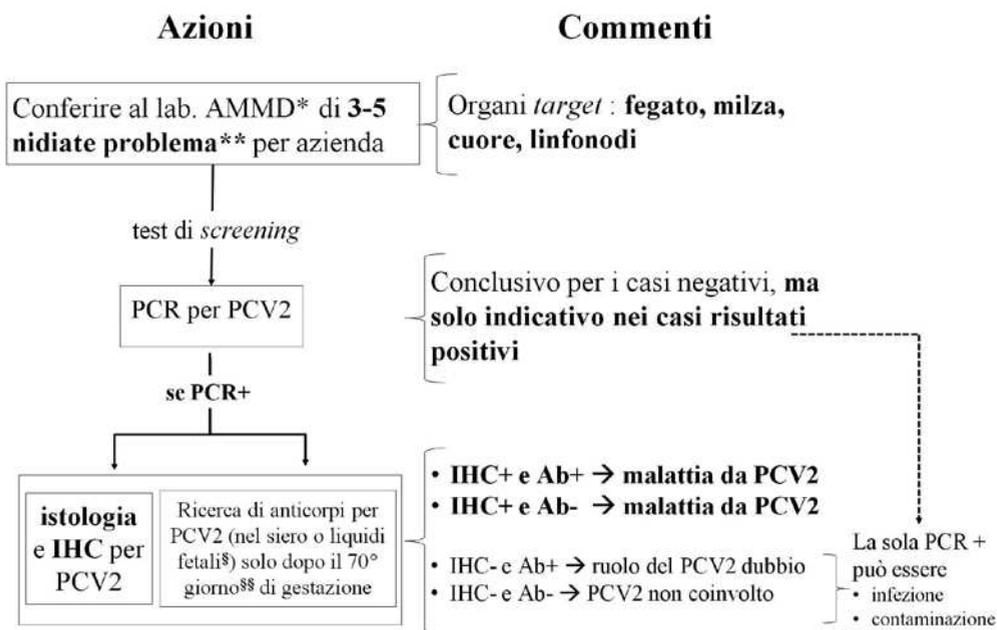
#### Protocollo diagnostico utilizzato

I campioni sono stati esaminati seguendo lo schema riportato in figura 1. Un pool ottenuto da tutti gli organi prelevati da ogni singolo feto è stato sottoposto a PCR per PCV2 (Sarli *et al.*, 2010). Su ogni singolo pool è stata inoltre eseguita la ricerca del genoma virale di PPV (porcine parvovirus), ADV (Aujeszky’s disease virus) e PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), rispettivamente secondo quanto descritto da Bonilauri *et al.* (2003), Katz e Pedersen (1992) e Kim *et al.* (2001). I casi in cui è stata evidenziata la presenza di PCV2 sono stati quindi sottoposti alle metodiche istologiche di routine per allestire sezioni di circa 4 micron da sottoporre a colorazione ematossilina-eosina (E-E) ed immunoistochimica (IHC). Per quest’ultima è stato usato un anticorpo monoclonale anti-PCV2 (Mab F217), alla diluizione di 1/100 in tampone fosfato, gentilmente fornito 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).

Sui sieri ottenuti per centrifugazione del campione di sangue prelevato è stata condotta la ricerca di anticorpi anti-PCV2 usando un kit (SERELISA® PCV2 Ab, Synbiotic, Lyon, France) (Perreul *et al.*, 2010), PPV, ADV e PRRSV utilizzando test ELISA di tipo competitivo, standardizzati presso l'IZSLER (Brocchi *et al.*, 1990; Cordioli *et al.*, 1996; Sala *et al.*, 2000).

La nidiata è stata considerata positiva quando almeno uno dei soggetti esaminati (proveniente dalla stessa nidiata) è risultato positivo alla ricerca del genoma virale (PCR+). Tuttavia, il PCV2 è stato considerato responsabile dell'episodio di patologia riproduttiva associato ad AMMD quando i campioni esaminati sono risultati positivi alla ricerca del genoma virale e contestualmente è stata messa in evidenza una positività all'IHC o alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 nel siero dei prodotti del concepimento. (fig. 1).



**Figura 1.** Diagramma di flusso del protocollo diagnostico in aziende con problemi riproduttivi in cui si sospetti un ruolo del PCV2. \* Aborto/Mummificato/nato-Morto/Disvitale; \*\*aborto o nidiata in cui si registrano almeno 4-5 mummificati/nati-morti/disvitali; §il siero si può ottenere prelevando il sangue dalla vena cava caudale mentre i liquidi fetali sono rappresentati dal materiale siero ematico che spesso si raccoglie nelle cavità in seguito a congelamento/scongelo del feto; §§feto/mummificato ≥170mm di lunghezza (testa-ischio prelevato con calibro rigido) (Straw *et al.*, 2006).

**Figure 1.** Flow chart of the diagnostic protocol in farms with reproductive failures suspected to be associated with PCV2 infection. \*Aborted/Mummified/stillborn/weak-born; \*\*abort or litter with more than 4-5 mummified/stillborn/weak-born piglets; §sampling blood from the caudal vena cava; fetal liquids are those collected from the body cavities after freezing and thawing; §§fetus/mummified ≥170mm in crown-to-rump length (Straw *et al.*, 2006).

## RISULTATI

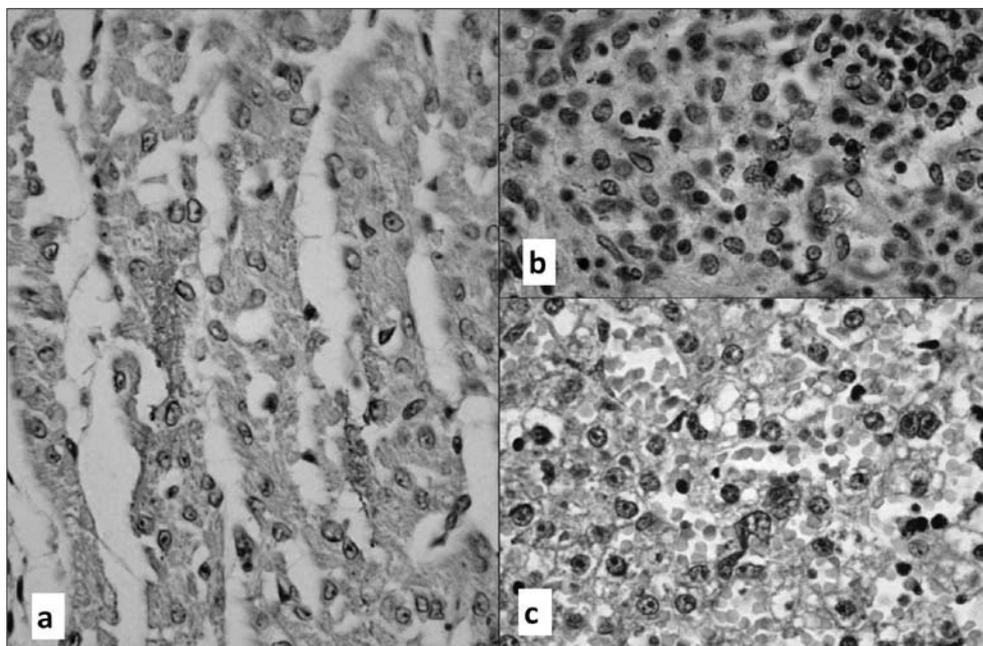
Nell'azienda A sono risultati PCR+, complessivamente, 14 dei 66 suinetti esaminati (21,2%); in 7 delle 15 nidiatae (46,7%) è stato rilevato almeno un soggetto PCR+ (tab. 1). Nell'azienda B sono risultati PCR+ 11 su 25 suinetti (44,0%) e 4 nidiatae su 6 (66,7%).

Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda A, il 35,2% dei suinetti era nato morto, disvitalo o mummificato; tale percentuale si riduce al 23,4% nelle nidiatae PCR-.

Nelle nidiatae positive provenienti dall'azienda B, il 32,1% dei suinetti era nato morto, disvitalo o mummificato mentre tale percentuale era del 22,2% nelle nidiatae PCR-.

La tabella 2 riporta i risultati ottenuti dalle valutazioni condotte considerando esclusivamente le nidiatae che potevano rientrare nella definizione di "nidiata problema", caratterizzate cioè da aborto o dalla presenza, sul totale dei nati, di almeno 4-5 soggetti caratterizzati da AMMD. Secondo questo criterio interpretativo, la percentuale di soggetti AMMD in nidiatae PCR+ passa dal 35,2% al 44,2% contro il 30,1% evidenziato nelle nidiatae PCR- dell'azienda A.

Le osservazioni necroscopiche ed istologiche non hanno mostrato lesioni riconducibili all'infezione da PCV2, mentre l'immunoistochimica (figura 2) ha evidenziato una seppur debole positività intracitoplasmatica negli epatociti, focale nei miocardiociti ed in rare cellule dendritiche nel linfonodo inguinale superficiale di due suinetti appartenenti ad una stessa nidiata dell'azienda A.



**Figura 2.** Suino. Soggetto nato morto: a. cuore, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel sarcoplasma di alcuni miocardiociti, 400x; b. linfonodo inguinale superficiale, moderata e focale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcune cellule dendritiche, 400x; c. fegato, debole e multifocale reazione immunoistochimica positiva per PCV2 nel citoplasma di alcuni epatociti, 400x.

**Figure 2.** Stillborn piglet: a. heart, multifocal and weak immunoistochemical positivity to PCV2 into the sarcoplasma of some myocardiocytes, 400x; superficial inguinal lymph node, focal and moderate immunoistochemical positivity to PCV2 in the cytoplasm of dendritic cells, 400x; c. liver, multifocal and weak immunoistochemical positivity to PCV2 in the cytoplasm of hepatocytes, 400x.

Solo due sieri sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-PCV2 e, in entrambi i casi, provenivano da soggetti PCR-, appartenenti a due differenti “nidiata problema” (un aborto PCR- ed una nidiata PCR+ con 11 nati morti su 18) dell’azienda A.

In nessuno soggetto esaminato è stato evidenziato il genoma di ADV, PRRSV o PPV o relativi anticorpi specifici.

## DISCUSSIONE

Secondo Segalés *et al.* (2006), la diagnosi di patologia riproduttiva associata all’infezione da PCV2 può essere emessa quando sono contemporaneamente presenti i seguenti aspetti: a) aumento del numero di AMMD, b) lesioni miocardiche fibrotiche e/o necrotizzanti, c) riscontro di PCV2 nel contesto delle lesioni. Tuttavia, alla luce di quanto riportato successivamente da Hansen *et al.* (2010) e Brunborg *et al.* (2007) questi tre criteri non sembrano sempre sufficienti a definire, escludendolo o dimostrandolo, il ruolo del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva. E’ noto infatti che la carica virale dimostrabile in corso di PCVD o PMWS (Brunborg *et al.*, 2004) è sensibilmente più elevata di quanto non sia dimostrabile nel caso di patologie riproduttive associate all’infezione da PCV2 (Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007). Ne consegue quindi che i criteri interpretativi impiegati per le PCVD e relativi alla quantità di virus presente nel contesto delle lesioni ( $10^7$  copie di DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto – Hansen *et al.*, 2010; Brunborg *et al.*, 2007) non possano essere estesi anche nei casi di patologia riproduttiva PCV2-associata. Altro aspetto critico da prendere in considerazione è rappresentato dalla diversa sensibilità delle tecniche di quantificazione della presenza del virus nei tessuti (IHC e real-time PCR) attualmente utilizzate. In considerazione del fatto che la soglia di sensibilità dell’IHC è relativamente alta, necessitando di almeno  $10^7$  copie di DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto, è evidente come le metodiche *in situ* possano frequentemente fornire esiti falsamente negativi. A tal proposito gli stessi Autori (Hansen *et al.*, 2010) suggeriscono che il riscontro in una nidiata di un feto con  $>10^7$  copie DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto o di due feti con  $10^4$ - $10^7$  copie DNA virale per 500ng di acido nucleico estratto sia sufficiente per formulare, utilizzando una tecnica real-time PCR, la diagnosi di episodio di patologia riproduttiva sostenuta da PCV2.

In una sola delle due aziende prese in esame nel corso del presente lavoro (azienda A), il protocollo impiegato, seppur con il conferimento di AMMD da 10 “nidiata problema”, ha messo in evidenza delle reazioni positive alla tecnica *in situ* utilizzata (IHC) portando ad ipotizzare che PCV2 possa aver avuto un ruolo nel determinismo dei problemi riproduttivi osservati nell’allevamento.

Nell’azienda B, di cui sono stati conferiti AMMD da 4 nidiata, l’intero iter diagnostico si è concluso solo con l’ipotesi di una probabile infezione da PCV2. Altro aspetto sicuramente meritevole di approfondimenti, ma di per sé interessante anche se non statisticamente significativo, è che i risultati mostrano in entrambe le aziende una percentuale di AMMD più alta in nidiata PCR+ rispetto alle PCR-, differenza che tende ad aumentare valutando in modo più restrittivo i risultati stessi. Questi aspetti assumono maggiore importanza qualora, come nel caso dell’azienda A, due suinetti presentano anticorpi anti-PCV2 e nessuna evidenza, diretta o indiretta, di infezione sostenuta da PPV, PRRSV e ADV.

## CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati presentati seppur preliminari e delle considerazioni esposte, l’impiego di tecniche *in situ* quali IHC per la diagnosi di patologia riproduttiva associata a PCV2 non sembrano da sole garantire un sufficiente livello di sensibilità.

A tal proposito si può concludere che, per la corretta valutazione di un possibile coinvolgimento del PCV2 in episodi di patologia riproduttiva, è indispensabile:

1) inviare al laboratorio tutti i soggetti AMMD, provenienti da nidiata con più di 4-5 AMMD

- e, possibilmente, inviare non meno di 6-7 nidiate per azienda;
- 2) prestare particolare attenzione alle modalità di prelievo dei campioni da esaminare allo scopo di evitare contaminazioni;
  - 3) quando possibile, prelevare il sangue per la ricerca di anticorpi specifici per PCV2 ed altri agenti abortigeni dalla vena cava caudale o, come descritto da Perreul et al. (2010), prelevando liquidi fetali intracavitari.

## **RINGRAZIAMENTI**

Gli autori ringraziano L. Mieli, Laboratoire de Développement et d'Analyses 22 (LDA22), Saint-Brieuc, France.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi 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.
2. 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 gl-deleti". *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* **44**, 913-917.
3. Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F., Schonheit J., (2007) "Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study". *J Vet Diagn Invest* **19**, 368-375.
4. Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. (2004) "Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR." *J Virol Methods*. **122**:171-178.
5. Chae C. (2005) "A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases". *Vet J* **169**, 326-336.
6. 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.
7. Corradi A., Dottori M., Gaiadella L., Rosignoli C., Cantoni A.M., Luppi A., Bonilauri P., Meriardi G., Faccini S., Costa A., Leotti G., Cabassi E. (2004) "Infezione da porcine circo virus tipo 2 (PCV2) e aborto". *Atti XXX Meeting Annuale SIPAS*, 215-221.
8. Hansen MS, Hjulsgaard CK, Bille-Hansen V, Haugegaard S, Dupont K, Høgedal P, Kunstmann L, Larsen LE. (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol.* **144**, 203-209.
9. 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.
10. 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**, 304-305.
11. 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.
12. O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan

- G, Ellis JA. (2001) "Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit." *Can Vet J.* 42, 551-3.
13. Perreul G., Fily B., Longo S., Vila T., Herin JB., Venet J., Joisel F. (2010) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) prevalence in abortions in France". Proceedings of the 21<sup>st</sup> IPVS Congress, Vancouver, Canada July 18-21, p. 1111.
  14. 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.
  15. Sarli G., Morandi F., Panarese S., Bacci B., Ferrara D., Fusaro L., Bacci M.L., Govoni N., Dottori M., Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F. (2010) "Scrofe convenzionali fecondate con seme artificialmente infettato con circovirus suino tipo2 (PCV2)". XXXVI Congresso SIPAS, 25-26 Marzo, Montichiari, Brescia (Italy), pp. 254-263.
  16. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) "Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy". *Vet Rec.* 164, 519-523.
  17. Segalés J., Allan G.M., Domingo M., (2006) "Porcine circovirus diseases". In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 299–307.
  18. Segalés J., Allan G.M., Domingo M. (2005) "Porcine circovirus diseases". *Anim Health Res Rev* 6, 119-142.
  19. Sorden S.D. (2000) "Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)". *Swine Health Prod.* 8, 133-136.
  20. Straw B.E., Dewey C.E., Wilson M.R. (2006) "Differential Diagnosis of Swine Diseases". In: *Diseases of Swine*, ed. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, and Taylor DJ, 9th ed., Chapter 3, pp. 41-85. Ames, IA.
  21. West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. (1999) "Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2". *J Vet Diagn Invest.* 11, 530-2.

# CINETICA DELLO SVILUPPO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA IN SUINI SOTTOPOSTI AD INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS DELLA PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME (PRRS)

## *TIME-COURSE OF THE IMMUNE RESPONSE IN PIGS AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME VIRUS (PRRSV)*

DOTTI S., FERRARI M., LOMBARDO T., MARTINELLI N., RAZZUOLI E., VILLA R., AMADORI M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

**Parole chiave:** immunità, PRRSV, IgA

**Key words:** immunology, PRRSV, IgA

**Riassunto.** Scopo di questo lavoro è stato confrontare lo sviluppo temporale dell'immunità umorale e cellulo-mediata in animali *specific pathogen free* (SPF) sottoposti ad infezione sperimentale con il virus della PRRS (tipo I); in particolare, sono stati analizzati anticorpi IgM-IgG, interferon (IFN)- $\alpha$  sierico, IFN- $\gamma$  sierico ed IgA salivari. Tali parametri sono stati valutati al fine di evidenziare possibili differenze nello sviluppo e nella cinetica della risposta immunitaria nei confronti del virus della PRRS. Gli animali sono stati inoculati con l'agente eziologico per via endonasale due volte, a distanza di 35 giorni l'una dall'altra, per un'osservazione totale di 60 giorni. Una prima analisi dei risultati emersi da questo lavoro ha permesso di evidenziare la presenza di una corretta stimolazione della componente umorale della risposta immunitaria, come già dimostrato in studi precedenti, mentre la risposta virus-specifica in IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  risultava essere assente. Per quanto riguarda le IgA specifiche a livello salivare, è stato evidenziato un andamento altalenante, che non sembra rispecchiare dal punto di vista temporale quello degli anticorpi sierici. Questi dati, da approfondire in studi ulteriori, serviranno a finalizzare le metodiche descritte all'utilizzo nelle condizioni di campo.

**Abstract.** The aim of this study was to compare the time-course of the humoral and cell-mediated immune response in specific pathogen free (SPF) animals to a PRRS virus experimental infection. In particular, serum IgM-IgG antibody, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and mucosal IgA were analyzed. These parameters were evaluated to highlight possible differences in the development of the immune response to PRRSV. Animals were inoculated with PRRS virus by the endonasal route twice, 35 days apart over a total period of 60 days. Data showed a correct humoral response, as demonstrated by others, whereas neither IFN- $\gamma$  nor IFN- $\alpha$  virus-specific responses were detectable. On the other hand, specific mucosal IgA antibody was fluctuating and its time-course was different from that of serum IgG. These data, to be confirmed in further studies, will be finalized to employ the relevant diagnostic methods on field samples.

### INTRODUZIONE

Nell'ambito delle numerose ricerche volte all'approfondimento delle conoscenze nei riguardi del virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS), uno dei temi principali è rappresentato dalla risposta immunitaria; questo argomento rappresenta da sempre uno dei punti meno chiari per comprendere la patogenesi e la reazione dell'ospite nei confronti del virus. La risposta di tipo umorale è quella di più semplice indagine mediante tecniche diagnostiche

routinarie, mentre quella cellulo-mediata è più complessa da indagare sia dal punto di vista delle metodiche di laboratorio utilizzate, che delle difficoltà di interpretazione. Inoltre, di recente, si è cercato di indagare anche altri aspetti connessi alla risposta immunitaria, data la carenza di informazioni e di successi ottenuti nel controllo di questa patologia. Tale approccio ha previsto la valutazione degli anticorpi mucosali (IgA) e la ricerca del virus della PRRS anche nel fluido salivare degli animali (2, 4).

Scopo di questo lavoro è stato valutare la risposta immunitaria di suini *specific pathogen free* (SPF) sottoposti ad infezione sperimentale con PRRSV; in particolar modo, è stato analizzato lo sviluppo della risposta immunitaria umorale e di quella mucosale rispetto alle possibili differenze dal punto di vista della precocità e della durata. Inoltre, è stata analizzata la risposta degli stessi soggetti ad un secondo contatto con virus omologo. Tale ricerca è risultata particolarmente utile al fine della messa a punto di una metodica ELISA atta a valutare la presenza di IgA specifiche contro il virus della PRRS e per un confronto nello sviluppo della risposta umorale e cellulo-mediata.

## MATERIALI E METODI

12 suini SPF di circa 40 giorni di vita sono stati sistemati nell'unità di isolamento di IZSLER (Brescia) e suddivisi in due gruppi: 10 animali rappresentavano i soggetti dell'infezione (gruppo 1) e 2 quelli di controllo (gruppo 2), stabulati in ambienti separati. Tutti i suini sono stati controllati per una settimana prima di procedere con la prova sperimentale al fine di consentire l'acclimatamento al nuovo ambiente. Quindi, il gruppo 1 è stato sottoposto ad infezione con il virus della PRRS; l'inoculo era rappresentato da un isolato di campo di tipo I e titolato su MARC-145 (pari a  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml). Ai soggetti è stato somministrato per via endonasale un quantitativo di 2 ml di virus, mentre il medesimo quantitativo di PBS è stato inoculato ai soggetti di controllo. Al giorno 35 post-inoculo, i soggetti del gruppo 1 sono stati nuovamente infettati con il medesimo virus e il gruppo 2 è stato inoculato con PBS con le medesime modalità.

Gli animali sono stati monitorati per un totale di 60 giorni sia dal punto di vista clinico, sia da quello delle indagini di laboratorio. A tal fine, è stata controllata l'eventuale presenza di segni clinici ed una volta sacrificati è stato effettuato l'esame necroscopico di tutti i soggetti. Le indagini hanno previsto di valutare il siero (Real Time RT-PCR, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM-IgG), il plasma (IFN- $\gamma$  come risposta al virus *in vitro*) e la saliva (IgA).

I prelievi ematici e salivari sono stati effettuati con cadenza settimanale dal T0 al T60 mediante l'utilizzo di provette con e senza litio-eparina per il sangue e salivetten® per la saliva. I campioni sono stati trattati in laboratorio per il recupero rispettivamente di siero, plasma e fluido orale. La presenza di IgM e di IgG è stata valutata mediante l'utilizzo di kits del commercio: *LSI PRRS/SDRP-Lissieu, France*; ed *Herdcheck IDEXX Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kit*; l'analisi è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore. Il siero è stato utilizzato anche per rilevare la presenza di RNA virale mediante RT-Real Time PCR (2) e sottoposto a test ELISA per la quantificazione di IFN- $\gamma$  (2). La valutazione di quest'ultima citochina è stata eseguita anche su campioni di sangue intero previo contatto del medesimo con PRRSV, PBS e MARC-145 per 20 ore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. La lettura della piastra si eseguiva con spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. I campioni erano considerati positivi se l'OD corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS era maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 50 mOD di differenza. L'analisi per valutare la presenza di IFN- $\alpha$  sierico è stata effettuata utilizzando un anticorpo primario (mAb F17, 4  $\mu$ g/ml) e un anticorpo secondario (mAb biotinilato Mab-K9 1  $\mu$ g/ml); la reazione si rivelava mediante l'utilizzo di streptavidina HRP-coniugata e ortho-phenilenediamina. La lettura veniva eseguita mediante spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm.

La saliva degli animali è stata valutata per Ab IgA anti-PRRSV tramite metodica ELISA; il test è

stato compiuto previo contatto dei campioni di saliva sia con virus della PRRS purificato sia con solo tampone in fase solida, al fine di evidenziare eventuali segnali di tipo aspecifico. La metodica prevedeva di evidenziare IgA PRRSV-specifiche mediante l'impiego di coniugato anti-IgA suine HRP e di ortho-phenilenediamina al fine di effettuare la lettura a 492 nm. Il risultato è espresso come differenza della media ottenuta dai campioni messi a contatto con l'antigene e la media di quelli senza il medesimo. Il valore di riferimento è pari a 20 mOD.

I due animali di controllo sono stati sottoposti alle medesime analisi indicate per il gruppo 1.

## RISULTATI

L'esame clinico degli animali del gruppo 1 ha evidenziato un lieve abbattimento del sensorio e disappetenza nei primi giorni dell'infezione sperimentale. Non è stata riscontrata sintomatologia respiratoria.

Le analisi in Real Time RT-PCR del siero degli animali del gruppo 1 hanno evidenziato la presenza di RNA riconducibile a PRRSV in tutti i soggetti a partire dal T7, con una negativizzazione al T14 (tranne 1 animale). Tutti gli animali sono risultati negativi fino al T35; al secondo contatto con il virus omologo è stata riscontrata positività al T35 di un solo animale prima del secondo contatto col virus, mentre sono risultati tutti negativi in tempi successivi fino al termine della prova. All'esame necroscopico non sono state riscontrate lesioni a carico dell'apparato respiratorio e di altri organi, nonostante dalle indagini di laboratorio sia emerso che amigdale, linfonodi polmonari ed inguinali erano positivi in real Time RT-PCR, mentre tutti i polmoni sono risultati negativi.

Per quanto riguarda la risposta umorale, si è evidenziata la presenza di IgM al T7 in 2 soggetti, con una graduale conversione verso IgG a partire dal T14 che si è completata al T21 ed è perdurata fino al termine della prova (T60).

La valutazione dell'immunità cellulo-mediata ha consentito di verificare livelli di IFN- $\gamma$ , con un aumento di tali valori a partire dal T7 (risposta aspecifica), con un andamento altalenante fino al T28; il secondo contatto con il virus omologo non ha comportato nessuna risposta negli animali e lo stesso risultato è stato riscontrato anche nei prelievi successivi.

L'analisi della presenza di IFN- $\alpha$  sierico negli animali infettati ha messo in luce una mancata stimolazione di questa citochina durante tutta la prova.

La saliva recuperata dai tamponi ottenuti da ciascun soggetto ha evidenziato la positività di due soggetti al T7 (valori > a 60 mOD), sette al T14, con una successiva negativizzazione al T21. Al secondo contatto cinque animali positivi al T42, sette al T49, con un ritorno entro i limiti di rilevabilità del test al T60.

Gli animali del gruppo 2 non hanno presentato ipertermia e segni clinici di malattia durante tutta la durata della prova sperimentale e sono risultati negativi a tutte le prove di laboratorio eseguite.

## DISCUSSIONE

Le analisi compiute hanno evidenziato negli animali del gruppo 1 la presenza del virus a livello sierico e la sua localizzazione nelle amigdale, confermando quanto descritto da altri autori (4). La comparazione tra l'immunità umorale (IgG) e quella cellulo-mediata (IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ ), ha messo in luce una totale sieroconversione degli animali infettati a partire dal T7 che si è completata al T14 e mantenuta fino alla fine della prova; tale capacità di risposta non si è estrinsecata a livello cellulare, in quanto i soggetti hanno presentato livelli plasmatici di IFN- $\gamma$  di tipo aspecifico verso PRRSV. Ciò implica che gli animali riconoscevano "l'aggressione" da parte di un agente esterno con un meccanismo non specifico per il virus PRRS, probabilmente riferibile a cellule "Natural Killer" (CD3-, CD8 $\alpha^{\dim}$  nel suino); soprattutto, tale risposta non si è sviluppata nei successivi prelievi ematici ed è rimasta assente dopo il secondo contatto con il medesimo virus. Anche per IFN- $\alpha$  è stata dimostrata una mancanza di risposta nei confronti dell'infezione, anche dopo il T35.

L'ulteriore indagine per la valutazione delle immunoglobuline mucosali (IgA) a livello salivare, specifiche per PRRSV, ha evidenziato che vi è stata una risposta con un andamento altalenante al primo contatto (aumento al T14), con valori superiori a 20 mOD a partire da T7 dopo la seconda infezione, che si sono mantenuti anche nei prelievi successivi. Tale andamento è differente rispetto a quello dell'immunità umorale sierica, dove, come scritto precedentemente, gli animali hanno una cospicua e stabile risposta in IgG; questa diversa cinetica anticorpale, che andrà ulteriormente approfondita ed indagata, potrebbe essere spiegata da una possibile alterazione da parte del virus non solo della risposta cellulo-mediata, ma anche di quella mucosale, nell'ambito dei meccanismi patogenetici che consentono al virus di dispiegare la sua attività patogena.

## CONCLUSIONI

La PRRS è una malattia che presenta molti lati oscuri, non essendo totalmente chiarita l'effettiva interazione tra l'ospite e il virus e in che modo quest'ultimo agisca sul sistema immunitario del suino. Una migliore comprensione di tali meccanismi sarebbe pertanto di notevole utilità sia ai fini della prevenzione che del controllo della malattia (5). A tale fine, le infezioni sperimentali presentano il vantaggio di poter monitorare gli animali in tempo reale senza che vi siano condizioni alteranti la prova; tuttavia, esse non rispecchiano pienamente tutte quelle situazioni di campo cui gli animali sono sottoposti durante il loro ciclo produttivo (6). Quindi, la scelta di eseguire una prova di questo tipo è stata dettata dalla necessità di paragonare la risposta immunitaria di tipo umorale (IgM-IgG), quella cellulare (IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ ) e quella mucosale (IgA) e di verificare l'eventuale differenza nell'evoluzione di queste. Tali analisi sono state particolarmente utili anche al fine della messa a punto di metodiche ELISA per la valutazione delle differenti risposte. Attualmente, le possibilità di indagare in modo efficace la risposta cellulo-mediata sono limitate a pochi laboratori. Anche per questo motivo un'ulteriore approfondimento di tali metodiche sarebbe particolarmente utile e di fondamentale importanza per riuscire ad impiegare al meglio i *tests* a disposizione.

Questi dati rappresentano un primo approccio per una valutazione più ampia delle problematiche immunologiche nell'ambito di PRRS, che dovranno essere ulteriormente convalidati da prove di campo (3, 6).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Diaz de Arce H., Artursson K., L'Haridon R., Perers A., La Bonnardiere C., Alm G.V. (1992). "A sensitive immunoassay for porcine interferon-alpha". *Vet. Immunol. Immunopathol.* **30**, 319-327.
- 2) Dotti S., Villa R., Sossi E., Guadagnini G., Salvini F. Ferrari M., Amadori M. (2010) "Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs", doi:10.1016/j.rvsc.2010.06.011
- 3) Gradassi M., Pavesi R., Boniotti B., Nassuato C., Giovannini S., Giacomini E., Bellini S., Pacciarini M., Alborali L. (2010) "PRRSV in campioni di fluido orale: studio longitudinale in condizioni di campo". in: XXXVI "Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Montichiari, 25-26 Marzo", Italia, 225-231.
- 4) Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?". *Virus Res.* **1-2**, 170-6.
- 5) Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Evans RB, Zimmerman JJ "Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions". (2008) *J Vet Diagn Invest.* **2**, 156-63.
- 6) Prickett JR, Zimmerman JJ. (2010) "The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine". *Anim Health Res* **2**:207-16.

**INDAGINE SIEROLOGICA NEI CONFRONTI DEI SOTTOTIPI  
H1N1, H1N2 E H3N2 DEL VIRUS INFLUENZALE IN  
ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI AFFETTI DA SINDROME  
RESPIRATORIA NELL'ANNO 2009**

***SEROPREVALENCE OF H1N1, H1N2, H3N2 INFLUENZA VIRUS IN  
ITALIAN PIG FARMS AFFECTED BY RESPIRATORY  
DISORDERS IN 2009***

FONI E<sup>1</sup>.; ZANNI I<sup>1</sup>.; CHIAPPONI C.<sup>1</sup>.; LEOTTI G<sup>2</sup>.; VILA T<sup>3</sup>.

*1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini"  
Sezione di Parma; 2) Merial Italia, Milano; 3) Merial S.A.S., Lione, Francia*

**Parole chiave:** influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, sierologia

**Key words:** swine influenza, H1N1, H1N2, H3N2, serology

**Riassunto.** Una indagine sierologica nei confronti dei virus influenzali suini H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 e H3N2 A/sw/Gent/1/84 è stata condotta tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione su 500 sieri suini, raccolti nel corso dell'anno 2009, provenienti da 25 allevamenti prevalentemente situati nel Nord Italia che avevano presentato, circa tre settimane prima, sintomi clinici di affezione respiratoria. I risultati hanno permesso di verificare che il 44% degli allevamenti presentava anticorpi nei confronti del sottotipo H1N1, il 32% nei confronti del sottotipo H3N2, mentre nei riguardi del sottotipo H1N2 si è osservata risposta anticorpale diversificata a seconda che nella prova venisse utilizzato lo stipite di riferimento A/sw/It/1521/98 o lo stipite di recente isolamento A/sw/It/284922/09. Si conferma l'importanza della attività di sorveglianza epidemiologica della circolazione dei virus influenzali nella popolazione suina e dello studio delle caratteristiche antigeniche e genetiche dei virus influenzali isolati da focolai di forme respiratorie, anche al fine di poter mantenere l'aggiornamento degli stipiti utilizzati come reagenti nelle prove sierologiche. Per quanto riguarda i dati relativi alla positività sierologica nei confronti del virus vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 i risultati, con solo un allevamento positivo, confermano una scarsa capacità di diffusione di questo stipite nei nostri allevamenti.

**Abstract.** A serological survey on 500 swine sera, collected from 25 Italian farms (16 farrow to finish, 4 fattening and 5 multi site herds) that had been affected with acute respiratory clinical signs, was performed submitting the samples to inhibition of haemoagglutination test against swine influenza strains: H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemic A/sw/Italy/290271/09, H3N2 A/sw/Gent/1/84. Globally 76% of farms tested were positive for at least one swine influenza virus, in particular 44% of the farms were positive to H1N1 subtype, 32% were positive to H3N2 subtype, while as regards H1N2 subtype the results showed 20% of positivity to the reference strain A/sw/It/1521/98, but 56% of positive response was detected if the recent reassortant Italian strain A/sw/It/284922/09 was used in the test. This observation suggests that the use of updated strains, adapted to the local epidemiological situation is a major asset for improving the accuracy of swine influenza surveillance programmes. Only one of the tested herds showed antibodies against vH1N1Pandemic A/sw/Italy/290271/09 strain.

## INTRODUZIONE

I virus influenzali appartengono alla famiglia *Orthomixoviridae*, all'interno del quale si possono trovare tre generi : A, B e C. Gli stipiti vengono distinti in sottotipi in base alle caratteristiche degli antigeni 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. Negli ultimi anni, è stata osservata una discreta stabilità antigenica e genetica per i sottotipi H1N1 e H3N2, mentre per il sottotipo H1N2 è stata documentata una variabilità genetica (Moreno A.M., 2009). 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 italiano (Moreno A.M., 2010). La concomitante presenza della circolazione dei tre sottotipi nella popolazione suina italiana è già stata documentata negli anni passati sia da dati epidemiologici virologici (Foni E., 2010) che dalla disamina di dati sierologici (Van Reeth K. 2008). Studi più recenti, condotti in allevamenti francesi, hanno inoltre dimostrato, proprio per il sottotipo H1N2, come sia possibile rilevare una variabilità di risposta a seconda dello stipite virale utilizzato (Foni E. 2010a) e anche come questa diversa risposta anticorpale possa essere statisticamente significativa (Foni E., 2010b). Alla luce di queste valutazioni, è stato ritenuto opportuno aggiornare le conoscenze riguardo alla risposta sierologica nei confronti dell'influenza suina in allevamenti intensivi italiani che avevano presentato disordini a livello respiratorio, in particolare si è ritenuto opportuno valutare la risposta anticorpale sia nei confronti degli stipiti considerati di riferimento per i virus influenzali suini italiani, ma anche nei confronti del virus pandemico H1N1 e nei confronti di un recentissimo stipite del sottotipo H1N2.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo Maggio 2009-Dicembre 2009 sono stati presi in considerazione 25 allevamenti suini, situati per la maggior parte nelle regioni del Nord Italia, nei quali non veniva praticata la vaccinazione nei confronti dei virus influenzali. In particolare si sono considerati 16 allevamenti da riproduzione a ciclo chiuso, 4 allevamenti all'ingrasso e 5 allevamenti multisito (2 unità in svezzamento e 3 in finissaggio). In questi allevamenti, nei quali erano stati osservati segni clinici di sindrome respiratoria, sono stati eseguiti prelievi di sangue a tre settimane dalla loro insorgenza. In particolare negli allevamenti a ciclo chiuso sono stati prelevati 10 campioni di sangue dalle scrofe e 10 dai suini all'ingrasso, mentre nelle altre tipologie di allevamento sono stati prelevati 20 campioni. In totale sono stati raccolti 500 campioni di sangue. I campioni di siero sono poi stati sottoposti a ricerca di anticorpi, tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) (Van Reeth K., 2008) nei confronti dei virus influenzali: H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09, H3N2 A/sw/Gent/1/84. I risultati ottenuti sono stati valutati secondo i seguenti canoni: ciascun siero è stato considerato positivo nei confronti del virus testato se presentava titolo  $\geq 1:20$ , ciascun allevamento era valutato positivo nei confronti della valenza considerata se almeno due sieri presentavano un titolo  $\geq 1:20$ . Per evitare interpretazioni errate legate a cross reattività di uno stesso siero nei confronti di 2 sottotipi diversi, il campione veniva considerato non positivo nei confronti di un determinato sottotipo qualora il valore assunto presentasse una differenza maggiore di 3 diluizioni a confronto con il valore presentato per l'altro sottotipo.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica hanno permesso di osservare che 19 allevamenti (76%) presentavano risposta sierologica positiva nei confronti di almeno un sottotipo di virus influenzale suino. In particolare, come mostrato nella tabella 1, il 44 % degli allevamenti presenta positività anticorpale nei confronti del sottotipo H1N1 e il 32 % delle aziende presenta positività nei confronti del sottotipo H3N2. Per quanto riguarda il sottotipo H1N2 si è osservata una dicotomia nella risposta a seconda che si considerino i titoli nei confronti dello stipite di riferimento A/sw/It/1521/98 (20%) o dello stipite più recente A/sw/It/284922/09 (56%). Inoltre, come mostrano i dati raccolti nella tabella 2, l'utilizzo nella reazione sierologica del sottotipo di recente isolamento ha permesso di evidenziare un maggior numero di sieri che rispondevano a più alto titolo.

Ancora una volta si conferma l'importanza della sorveglianza epidemiologica della circolazione degli stipiti influenzali nell'allevamento suino per poter mantenere il monitoraggio di eventuali variazioni antigeniche di ceppi isolati da focolai di forme respiratorie, al fine di poter poi procedere ad un doveroso e continuo aggiornamento dei virus utilizzati nelle prove sierologiche che altrimenti rischiano di non fornire quadri fedeli dell'epidemiologia dell'infezione.

Confrontando questi dati sierologici con quelli ottenuti in anni precedenti (Van Reeth K. 2008), si può notare un certo decremento della percentuale di positività degli allevamenti nei confronti del sottotipo H1N1 che negli anni 2003 era vicina all'83%. Considerando che dal 2003 ad oggi, la circolazione del sottotipo H1N1 non ha manifestato segni di decremento (Foni E. 2010c), si profila la necessità di ulteriori studi di approfondimento per la definizione delle caratteristiche genetiche dei virus influenzali sottotipo H1N1, al fine di verificare che, se pur minime, le variazioni subite da questo sottotipo negli ultimi anni non evocino nell'animale infetto una risposta anticorpale che possa non essere adeguatamente svelata dall'utilizzo di stipiti di riferimento storici e quindi ormai datati.

I dati raccolti per quanto riguarda lo stipite vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 confermano la ridotta capacità di diffusione di tale virus negli allevamenti anche quando gli stessi siano localizzati in aree ad alta densità di allevamenti suini intensivi, come è il caso della maggior parte dei 25 allevamenti qui considerati.

**Tabella 1:** *Esiti indagine sierologica nei confronti di virus influenzale suino in 25 allevamenti italiani tramite IEA.*

<b>Stipite</b>	<b>N° allevamenti positivi/testati</b>	<b>% positività</b>
H1N1 A/sw/Finistere/2899/82	11/25	44%
H1N2 A/sw/Italy/1521/98	5/25	20%
H1N2 A/sw/Italy/284922/09	14/25	56%
H3N2 A/sw/Gent/1/84	8/25	32%
v H1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/2009	1/25	4%

**Tabella2** : *Confronto fra i titoli anticorpali ottenuti in IEA utilizzando due stipiti di virus influenzale suino. sottotipo H1N2.*

<b>Titolo IEA</b>	<b>&lt;20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>160</b>	<b>320</b>	<b>640</b>	<b>Totale</b>
H1N2 sw/Italy/1521/98	483	13	3	1	0	0	0	500
H1N2 sw/ Italy/284922/09	373	42	46	28	9	1	1	500

**RINGRAZIAMENTI** : Si ringraziano la Dr.ssa Ana Maria Moreno Martin per aver fornito lo stipite A/sw/Italy/290271/2009 e tutti i Medici Veterinari che hanno partecipato alla raccolta dei campioni per la realizzazione di questo studio di campo.

### **BIBLIOGRAFIA**

a Foni E., Bublot M., Chiapponi C., Herin J.B., Joisel F. , Perreul G., Zanni I., Vila T.(2010) Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European symposium on Porcine Health Management 26-28 May Hannover, Germany, p. 104.

b Foni E., Garbarino C., Chiapponi C. (2010) “Serological investigation on convalescent sera from swine influenza outbreaks in Northern Italy” 1<sup>st</sup> Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) 15-17 September 2010 Lelystad, The Netherlands.

c Foni E., Chiapponi C, Sozzi E, Barbieri I, Moreno AM, Merenda M, Luppi A, Alborali L, Cordioli P (2010) “Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia”. Atti Convegno SIPAS 36 - p 159-166

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.

Moreno A., Di Trani L., Alborali L., Vaccari G., Barbieri I., Falcone E., Sozzi E., Puzelli S., Ferri G., Cordioli P. (2010) “First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy”. Open Virol J. May 5;4:52-6.

Van Reeth K., Brown I.H., Dürrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., Pospisil Z., Koch G. (2008) “Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003”. Influenza Other Respiratory Viruses. May; 2 (3):99-105.

## DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI INFLUENZA (A/H1N2) IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO

### *DESCRIPTION OF AN INFLUENZA (A/H1N2) OUTBREAK IN A FARROW-TO-FINISH HERD*

BARDINI R.<sup>1</sup>, LEOTTI G.<sup>2</sup>, NIGRELLI A.D.<sup>3</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>3</sup>, FONI E.<sup>4</sup>,  
SARLI G.<sup>5</sup>, MORANDI F.<sup>5</sup>, GALUPPINI A.<sup>6</sup>, ZAMPERLIN D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trouw Nutrition, San Zeno di Mozzecane (VR); <sup>2</sup>Merial Italia, Milano; <sup>3</sup>IZSLER Mantova;  
<sup>4</sup>IZSLER Parma; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna;  
<sup>6</sup>Medico Veterinario, Casalmoro (MN)

**Parole chiave:** suino, Influenza, PRDC, patologia riproduttiva, H1N2.

**Key words:** pig, Influenza, PRDC, reproductive disorders, H1N2.

**Riassunto.** Gli Autori descrivono un focolaio di Influenza suina, sotto-tipo H1N2, in un allevamento a ciclo chiuso che ha coinvolto i suini destinati all'ingrasso ed anche il parco riproduttori, con sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio e riproduttivo. Il focolaio si è protratto per oltre un mese con coinvolgimento, in momenti successivi, di tutti i settori dell'allevamento. Le ricerche di laboratorio effettuate hanno evidenziato unicamente la presenza di virus influenzale, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*. La diagnosi di Influenza si è basata, oltre che su rilievi di natura clinica ed anatomo-patologica, del supporto di tecniche di laboratorio (RT-PCR da tamponi nasali, isolamento virale, esame istopatologico) ed anche di un Kit rapido che è stato utilizzato direttamente in allevamento (mediante tampone nasale). Gli Autori hanno quantificato in 129€ per ogni scrofa presente l'ammontare complessivo dei danni economici, rilevati nell'arco di tempo qui considerato, indotti da questo focolaio di Influenza (A/H1N2).

**Abstract.** The Authors describe an outbreak of swine influenza, subtype H1N2, in a farrow-to-finish herd. Finishers as well as breeders were involved in the outbreak, with respiratory and reproductive symptoms. The outbreak lasted for more than one month, involving all herd sectors in succession. Laboratory investigations identified the presence of Influenza virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. The diagnosis of swine influenza was based on anatomopathological findings, laboratory investigations (RT-PCR from nasal swabs, virus isolation, histopathology), and a rapid diagnostic kit used on farm (through nasal swabs). The Authors calculated that this outbreak of influenza (type A/H1N2), in its duration, caused a total loss of €129 for each present sow.

### INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza suina (SIV) è da sempre considerato uno dei più importanti agenti eziologici di malattia respiratoria in questa specie animale ed ha una diffusione elevata in molti paesi (Van Reeth et al., 2008).

Tale virus, considerato uno degli attori principali del cosiddetto complesso respiratorio del suino (PRDC), ha un'azione patogena primaria ed una riconosciuta azione "door-opener" come recentemente messo in evidenza in Italia (Gradassi et al., 2009) ed in altri paesi europei (considerato in Olanda responsabile del 44% dei focolai di malattia respiratoria nei suini in accrescimento) (Loeffen et al., 1999).

Le manifestazioni cliniche della forma classica di tale malattia sono note, ma l'influenza

nel suino spesso si manifesta in forme cliniche meno caratteristiche, come quella subclinica tipica degli allevamenti a ciclo chiuso ove il virus può permanere a lungo e dare luogo a manifestazioni cliniche ripetute nel tempo (Olsen et al., Diseases of Swine, 2006), oppure la cosiddetta forma “enzootica”, che colpisce tipicamente i suini di 6-7 settimane di vita, specialmente, quando le pratiche di “tutto-pieno/tutto-vuoto” non possono essere applicate compiutamente (Guilmoto et al., 2003). Recentemente un’ampia indagine di campo effettuata nel nostro paese ha evidenziato una notevole percentuale di diffusione dei virus influenzali nei suini in fase di svezzamento; tali virus sono stati isolati (o messi in evidenza) prevalentemente in seguito ad episodi clinici di forme respiratorie: ben il 54% delle positività totali ai SIV era concentrata in questa fascia di animali (Gradassi et al., 2009). E’ utile a tal proposito ricordare che un esteso monitoraggio sierologico di campo effettuato recentemente in Italia sulla durata degli anticorpi di origine materna evidenziò notevoli differenze di questo rilievo tra i diversi allevamenti analizzati (Candotti et al., 2003).

L’influenza del suino ha inoltre spesso delle conseguenze importanti anche sulla sfera riproduttiva, ove tale virus può essere responsabile, anche se per via indiretta (rialzo termico), di aborti, natimortalità, infertilità, nascita di nidiate di piccola taglia, ipogalassia, infertilità temporanea dei verri (Olsen et al., Diseases of Swine, 2006).

In Italia sono presenti e circolanti tutti e tre i sottotipi di SIV del suino (H1N1, H1N2, H3N2): l’incidenza degli ultimi 10 anni (dati IZSLER) dei tre sottotipi nei casi di malattia respiratoria è stata del 46% per H1N1, 28% per H1N2 e del 26% per H3N2; gli isolamenti dell’anno 2009 hanno comunque evidenziato una maggior frequenza di H1N2 rispetto al passato (19 isolati sui 54 totali di virus influenzale; 21 H1N1 e 13 H3N2) in tendenza con quanto già da tempo è registrato negli altri paesi europei: il sottotipo H3N2 non è più isolato in determinati paesi (Francia, Gran Bretagna) (Van Reeth et al., 2008; Foni et al., 2010).

Dal punto di vista diagnostico l’Influenza suina riconosce come metodica di riferimento l’isolamento virale (VI) il quale, oltre che a partire da organi, è anche pienamente utilizzabile con prelievi effettuati “in vivo”, mediante tamponi nasali (Barigazzi et al., 2003), RT-PCR, Sierologia (IHA ed Elisa), Immunofluorescenza, istologia ed immunistoichimica.

Recentemente lo studio dei virus influenzali si avvale anche di avanzate tecniche di analisi genetica ed inoltre sono stati recentemente impiegati dei Kit rapidi (Test Elisa su membrana) da utilizzare in campo su materiale organico prelevato mediante tamponi nasali.

Il tampone nasale su animali con Temperatura elevata (T°), pur essendo estremamente utile ai fini diagnostici delle forme influenzali, è però una pratica veterinaria ancora non adeguatamente sfruttata nel nostro paese.

L’incidenza economica dell’Influenza è considerata da tempo rilevante (Olsen et al., Diseases of swine, 2006; Gradassi et al., 2009), ma non sono molti i lavori reperibili in letteratura che quantifichino i danni economici indotti da un focolaio di Influenza suina (Olsen et al., Diseases of swine, 2006; Madec et al., 1992).

## **MATERIALI E METODI**

### *Caratteristiche dell’allevamento ove si è verificato il focolaio di Influenza*

Allevamento a ciclo chiuso, di 350 scrofe e rimonta interna (a parte l’acquisto annuale di 2 o 3 verri), con invio al macello dei suini grassi all’età di 9-10 mesi di vita (circuiti dei Prosciutti DOP). Tale allevamento non è indenne da malattia di Aujeszky, ma la circolazione di ADv è sottocontrollo, PRRS positivo e caratterizzato da un buon livello di management. L’allevamento è collocato in un’area pianeggiante a poche centinaia di metri da un fiume di medie dimensioni ed a qualche chilometro in linea d’aria da due laghetti utilizzati per la caccia alle anatre selvatiche, che arrivano numerose nell’area; nel raggio di 2 o 3 chilometri è situato inoltre anche un allevamento di tacchini ed uno di suini all’ingrosso.

I suini sono di una razza ibrida commerciale.

### *Sistema di raccolta dei dati*

Tutti i dati raccolti in allevamento sono stati forniti dal veterinario aziendale, dai proprietari dell'allevamento, compresa la giovane figlia dell'allevatore, Medico Veterinario anch'ella, che ci ha fatto avere alcuni rapporti scritti, documenti cartacei ed informatici.

### *Tamponi nasali*

La prima tappa dell'accertamento diagnostico è stata realizzata direttamente in allevamento, dal veterinario aziendale, con l'ausilio di un apposito "Kit di campo" (Merial® Flu Kit ) che contiene tutto il necessario per effettuare correttamente un prelievo di materiale organico mediante tampone nasale; in tale Kit è inserito anche un test rapido (FLU DETECT™ Swine, Synbiotics, Lione-Francia) che consente di rilevare la presenza di Virus influenzale di Tipo A da tamponi nasali ed è utilizzabile anche direttamente in allevamento. In tutti i casi comunque si è proceduto con l'invio al laboratorio di tamponi nasali classici per le indispensabili ricerche diagnostiche successive effettuate dagli IZSLER.

### *Accertamenti diagnostici*

Gli accertamenti diagnostici sono stati eseguiti in tre diversi laboratori:

*-IZSLER Mantova:* presso la Sezione di Mantova dell' IZSLER sono state effettuate indagini su 3 apparati respiratori e 6 tamponi nasali.

Sugli apparati respiratori si è proceduto al rilievo delle lesioni macroscopiche. Successivamente sono stati prelevati campioni di tessuto polmonare, dalle zone interessate dai processi patologici, per la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, PCV2, virus della Pseudorabbia e virus influenzale tipo A mediante diversi test PCR (Calsamiglia M. et al., 1999; Persia D. et al., 2001; Faccini S. et al., 2009; Ma W. et al., 2008; Spackman E. et al., 2002).

Sui tamponi nasali portati in laboratorio sono state ricercati i virus (PRRSV, Influenza A e Pseudorabbia) con le stesse metodiche PCR utilizzate per i tessuti polmonari.

Parte degli estratti ottenuti dai polmoni e dai tamponi utilizzati per la PCR e risultati positivi al virus influenzale tipo A, sono stati inviati all' IZSLER di Parma per la tipizzazione e caratterizzazione del ceppo.

Campioni di tessuto polmonare sono stati fissati in formalina e inviati al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna per indagini istopatologiche.

*-IZSLER Parma:* i tamponi 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 suino nei confronti di virus di referenza e di stipiti di campo dei sottotipi H1N2, H3N2, H1N1 e vH1N1 pandemic 2009 (OIE 2008) e tramite tecnica PCR (Chiapponi et al., 2003).

*-Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna:* campioni di 3 polmoni fissati in formalina durante la necropsopia effettuata presso la sezione di Mantova dell'IZSLER sono stati inclusi in paraffina. Due sezioni seriali di 4 micron di spessore sono state usate per la colorazione ematossilina-eosina.

## **RISULTATI**

### *Descrizione del caso clinico*

Le prime manifestazioni cliniche di natura respiratoria "influenza-like", sono state rilevate ai primi di Ottobre 2010 con una sintomatologia non eclatante, che interessava esclusivamente il settore dei grassi e dei magroni: il veterinario effettuò dei tamponi nasali per la ricerca di SIV e/o altri virus con esito negativo.

Dopo circa una settimana il settore delle scrofe andò incontro a rilevanti problematiche di natura riproduttiva: aborti, parti prematuri e riassorbimenti anche precoci, problematiche

che interessarono tutti gli stadi di gestazione. La problematica di natura riproduttiva continuò per una decina di giorni circa con problematiche che si erano anche estese ai suinetti neonati (disvitalità). Il Veterinario effettuò dei prelievi di sangue sulle scrofe ed in particolare su quelle che avevano abortito: le analisi in PCR esclusero viremia da PRRSv, tutti i sieri erano Aujeszky gE negativi, mentre i titoli per SIV evidenziarono dei titoli medio-alti (fino ad 1: 640). In seguito a tale rilievo il Veterinario consigliò di effettuare un richiamo di tutto il parco riproduttori con la vaccinazione antinfluenzale (associata al vaccino contro la Malattia di Aujeszky) mediante un nuovo vaccino (GRIPOVAC® 3, Merial, Lione, Francia) contenente tutti e tre (H1N1, H1N2, H3N2) i sottotipi circolanti in Italia negli allevamenti di suini: tale allevamento aveva già iniziato a vaccinare le scrofe con un vaccino associato Aujeszky-Influenza nel mese di Gennaio 2010 e dopo i due interventi della vaccinazione di base era stato effettuato il primo richiamo ad Aprile-Maggio, ma il vaccino antinfluenzale utilizzato inizialmente conteneva solamente i due sottotipi H1N1 e H3N2. Contestualmente le scrofe furono sottoposte ad un trattamento sintomatico antipiretico (Paracetamolo a 1000 ppm via alimento) ed antibiotico (Tiamfenicolo per 5 giorni al dosaggio di 800 ppm via alimento).

Pochi giorni dopo aver effettuato la vaccinazione e gli interventi sopra citati le gravi problematiche riproduttive cessarono, ma nel frattempo una grave e diffusa sintomatologia respiratoria “Influenza-like” si manifestò nel settore magronaggio-ingrasso (suini con pesi vivi variabili da 50 a 100 kg): nonostante l'immediato intervento con farmaci antipiretici (Acido Acetilsalicilico al dosaggio di mg 1000/40 kg di peso vivo) ed antibiotici (Tiamfenicolo per 5 giorni al dosaggio di 800 ppm via alimento) le manifestazioni cliniche si aggravarono e persistero per almeno una settimana, con una sintomatologia caratterizzata anche da una riduzione del consumo alimentare che arrivava fino a percentuali dell'80%.

Il 9 di novembre l'allevatore effettuò il richiamo di vaccinazione del parco riproduttori con il vaccino antinfluenzale più sopra citato.

Nel periodo dal 7 al 18 novembre la grave sintomatologia “Influenza-like”, caratterizzata da anoressia, dispnea, ipertermia, scolo nasale limpido ed abbondante su qualche soggetto, tosse secca “urlata” e poco produttiva, qualche vomito facilmente legato alla tosse, si spostò nel settore del secondo ingrasso (suini di peso vivo attorno a 120 kg) e si diffuse rapidamente (4 o 5 giorni) a tutti i suini grassi presenti.

Il 12 novembre il veterinario aziendale eseguì in allevamento, dopo aver effettuato i tamponi nasali, il Test rapido su cinque suini grassi (8 mesi di vita circa) e rilevò 5/5 positività (figura n° 1) delle apposite strisce reattive, con una prima conferma della diagnosi clinica di Influenza formulata dopo esame clinico dei suini colpiti. Al fine di validare in laboratorio la prima indicazione fornita dal Kit rapido, dopo quattro giorni furono effettuati n° 5 tamponi nasali in suini dello stesso settore, ma più giovani dei precedenti ed un tampone nasale da una scrofa con temperatura (aveva abortito da poco). Furono portati al locale laboratorio diagnostico (IZSLER Mantova) anche alcuni polmoni prelevati in azienda, dopo effettuazione di autopsia da parte del veterinario.

Tutti e sei i tamponi nasali risultarono altamente positivi per Influenza al test di RT-PCR; dopo l'esame anatomopatologico dei polmoni, che confermava la presenza di un diffuso edema interlobulare, Broncopolmonite apicale sub-acuta/cronica con presenza di lesioni “*mycoplasma like*” (lesioni a manicotto caratteristiche della Polmonite enzootica), associata a focolai multipli lobulari di polmonite acuta nei lobi diaframmatici, i test in PCR effettuati sugli organi confermarono la positività per Influenza (figura n°2) e *Mycoplasma hyopneumoniae*, mentre risultarono negativi per altri agenti eziologici (PRRSv, Aujeszky, PCV2); l'esame batteriologico permise di isolare, da un polmone, una *Pasteurella multocida*.

Nell'ultima settimana di Novembre il quadro clinico aziendale cominciò a migliorare gradualmente, ma essendo ancora presenti suini con T° ed un consumo alimentare ancora ridotto, furono continuate le terapie sintomatiche ed antibiotiche.

Il 25 novembre, dopo autopsia, fu portato all' IZSLER di Mantova un polmone di un giovane suino per ulteriori accertamenti: polmonite apicale cronica e negatività completa alla ricerca virale mediante diversi test PCR per SIV ed ancora una volta per PRRS, Aujeszky, PCV2, mentre fu isolata un'altra *Pasteurella multocida*.

#### *Accertamenti diagnostici eseguiti da IZSLER Parma*

I liquidi allantoidei e i sovrantanti cellulari di MDCK e CACO2 risultarono positivi per la presenza di virus emoagglutinante in cinque dei sei tamponi inoculati: il solo campione dal quale non fu possibile isolare il virus era quello dell'unica scrofa sottoposta ad analisi. Il test di IEA condotto con sieri iperimmuni nei confronti dei sottotipi H1N2, H3N2, H1N1 e vH1N1 pandemico 2009 permisero di identificare gli isolati come virus influenzale suino riferibili al sottotipo H1N2: anche la prova di tipizzazione tramite reazione PCR confermò l'appartenenza degli stipiti isolati al sottotipo H1N2. Le prove di caratterizzazione genetica condotte hanno permesso di inquadrare gli isolati nel gruppo dei virus influenzali suini H1N2 circolanti recentemente in Italia (Moreno, 2009).

#### *Accertamenti diagnostici eseguiti dalla Università di Bologna*

L'esame istologico permise di identificare una broncopolmonite cronica caratterizzata dalla presenza di numerosi granulociti neutrofili, sia nei lumi bronchiali/bronchiolari che negli alveoli, contenenti anche un essudato sieroso o talvolta fibrinoso. In aree non interessate da un chiaro processo broncopneumonico era apprezzabile il coinvolgimento dei piccoli bronchi e dei bronchioli, che mostravano necrosi dell'epitelio congiuntamente ad un essudato di neutrofili intraluminale e di scarsi linfociti nell'interstizio (bronchiolite necrotizzante) (figura 3). Una flogosi acuta con granulociti e linfociti era presente anche nella lamina propria e nella sottomucosa dei grossi bronchi (Figura 4). La bronchiolite necrotizzante è fortemente suggestiva di infezione da virus influenzali.

#### *Impatto economico del focolaio*

Per il calcolo, non certamente facile e sempre opinabile, delle perdite subite in seguito a questo grave e prolungato focolaio di Influenza (A/H1N2), ci avvaliamo dell'uso di una tabella che elenca sinteticamente le singole perdite produttive da un lato ed il loro impatto economico dall'altro.

Infine, uniformandoci a criteri spesso adottati dalla letteratura (Drèau et al., 2010), abbiamo suddiviso le perdite economiche per ognuna delle scrofe presenti, in modo da rendere più immediato e confrontabile l'impatto economico di questo focolaio.

Le partite dei suini colpiti dalla forma influenzale hanno raggiunto il peso di macellazione 15-20 giorni più tardi rispetto alle partite precedenti, dato in linea con quanto riportato dalla letteratura nei casi di episodi influenzali che colpiscono i suini da ingrasso (Olsen et al., Diseases of swine, 2006) (figura 5).

**Tabella 1:** Perdite produttive e relativo impatto economico del focolaio di Influenza (A/H1N2)  
**Table 1:** Productivity losses caused by the Influenza (A/H1N2) outbreak and relative economic impact

Periodo	Categoria animali	Morti*	Danni riproduttivi*		Costo economico delle terapie	Impatto economico perdite produttive*
			Parti prematuri Aborti	Riassorbimenti		
1-18 Ott.	Scrofe	2	43	21	500€ Paracetamolo	550 suinetti X 30€
19 Ott. 20 Nov.	Scrofe	-	2	-	500€ Paracetamolo	
						16.500€
22 -30 Ott.	Grassi	-	-	-	400€ Ac, Acetilsalicilico 800€ Tiamfenicolo	7.000 kg di Peso vivo in meno per mortalità x €1.440**
1-10 Nov.	Grassi	20	-	-	900€ Ac.Acetilsalico 1.600€ Tiamfenicolo	
11-20 Nov.	Grassi	40	-	-	900€ Ac. Acetilsalicilico 1.400€ SDM+TMP	
21-30 Nov.	Grassi	30+30 scarti)	-	-	-	
25-31 Ott.	Svezamento Magronaggio	-	-	-	500€ Ac.Acetilsalicilico 700€ Tiamfenicolo	
8-20 Nov.	Svezamento Magronaggio	20	-	-	500€ A.Acetilsalicilico 1.000€ Tiamfenicolo	
					<b>Totale spesa terapie</b>	9.700€
<b>Spesa smaltimento carcasse</b>			<b>7 tonnellate di carcasse x144€</b>			<b>1.000€</b>
<b>Spesa per antibiotici iniettabili</b>			<b>Tiamfenicolo, Ampicillina, cortisonici</b>			<b>1.130€</b>
<b>Mancato accrescimento dei suini in crescita</b>			<b>N° 2.500 suini x 0,5 kg/die x 7 giorni: 12.500 kg di mancato incremento nel periodo x 1,25€ (Prezzo p.v.)</b>			<b>15.625€</b>
<b>Mancato consumo di mangime per la ragione di cui sopra (da detrarre)</b>			<b>Grassi: -300 q di mangime x 23€</b>			<b>- 6.900€</b>
			<b>Magroni: -40 q di mangime x 40€</b>			<b>-1.600€</b>
<b>PERDITE ACCORPATE E SUDDIVISE PER OGNI SCROFA PRESENTE (N°350)</b>						<b>129€</b>

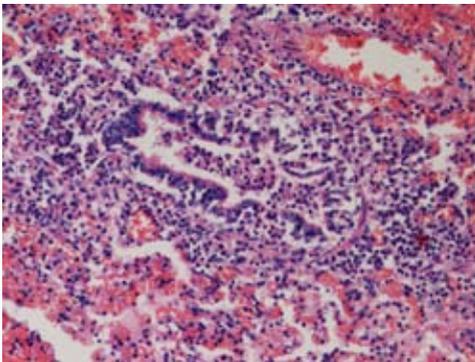
\*Le perdite qui calcolate sono quelle eccedenti le perdite storiche aziendali del periodo esaminato.

\*\*Questo prezzo è dato dalla somma del prezzo di mercato+premio+recupero IVA.



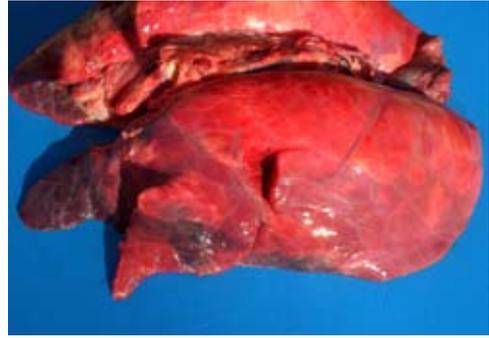
**Figura 1.** Kit rapido: 5/5 positivi per Influenza suina (2 linee rosa)

**Figure 1.** Quick test: 5/5 positive for swine influenza (2 pink/purple bands)



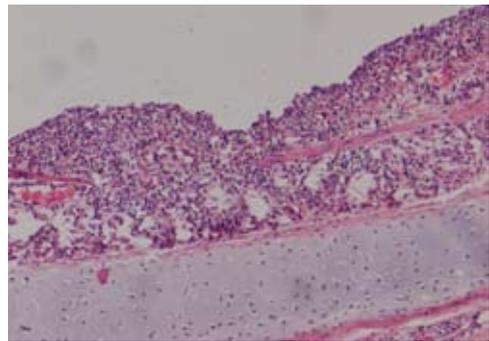
**Figura 3.** Suino. Polmone. Bronchiolite acuta con necrosi parziale dell'epitelio, detriti necrotici nel lume e cellule infiammatorie (granulociti neutrofili e linfociti) peribronchiolari. Iperemia alveolo-settale ed iniziale alveolite nel parenchima circostante. Ematossilina-eosina, 20x.

**Figure 3.** Swine. Lung. Acute bronchiolitis. Intraluminal necrotic debris and peribronchiolar infiltration by granulocytes and lymphocytes. Hyperemia of alveolar septa and alveolitis in the surrounding lung parenchyma. Haematoxylin-eosin, 20x.



**Figura 2.** Focolaio di Influenza suina: polmoni.

**Figure 2.** Swine Influenza outbreak: lungs.



**Figura 4.** Suino. Polmone. Bronchite acuta con infiltrato infiammatorio nella lamina propria e nella sottomucosa. Ematossilina-eosina, 10x.

**Figure 4.** Swine. Lung. Acute bronchitis showing inflammatory infiltrate in both lamina propria and submucosa. Haematoxylin-eosin, 20x.



**Figura 5.** Focolaio di Influenza suina: suini con febbre e riduzione del consumo di mangime

**Figure 5.** Swine Influenza outbreak: pigs with fever and feed-intake reduction

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo focolaio conferma l'attualità e importanza delle infezioni da virus influenzale nei suini, in quanto le manifestazioni cliniche sono state gravi e prolungate e si sono estese a gran parte dei settori di questo allevamento a ciclo chiuso. E' inoltre importante rilevare che tale virus, pur non avendo un'azione diretta e specifica sull'apparato riproduttore, si è rivelato in grado, in questo episodio, di determinare ingenti perdite anche nel settore riproduttivo.

Il virus influenzale che ha determinato tale focolaio è del sottotipo H1N2, un virus isolato sempre più spesso nel nostro paese, forse anche grazie a delle caratteristiche antigeniche piuttosto differenziate dagli altri sottotipi circolanti che ne facilitano la diffusione (Foni et al., 2010). Siamo a conoscenza che in anni recenti l'introduzione di tale sottotipo di virus influenzale in grandi allevamenti da riproduzione è stato in grado di indurre nei riproduttori delle serie e gravi conseguenze cliniche ed economiche, anche in allevamenti vaccinati da tempo contro i due sottotipi "classici" di virus influenzale (H1N1 e H3N2): l'episodio qui segnalato sembra riprodurre tali situazioni. Nel caso specifico l'introduzione nel solo parco riproduttori di un nuovo vaccino contenente anche il sotto-tipo H1N2, affiancato ad opportune terapie sintomatiche ed antibiotiche, ha coinciso con la risoluzione delle problematiche riproduttive: è interessante rilevare che, invece, nel settore della produzione (magroni e grassi), non vaccinati contro nessun virus influenzale, la sintomatologia si è protratta maggiormente nonostante l'applicazione tempestiva delle misure sintomatiche e terapeutiche più sopra citate.

Infine alcune considerazioni sulla diagnosi: le tecniche diagnostiche attualmente a disposizione del Veterinario per la conferma di un sospetto su base clinica di Influenza sono diverse, efficaci (VI, RT-PCR, Kit rapidi, ecc) e disponibili in molti laboratori diagnostici, ma certamente la raccolta di materiale organico da suini con T° effettuata in allevamento e tempestivamente (la durata di emissione virale dalle cavità nasali non sembra andare oltre i 7-8 giorni) (Olsen et al., Diseases of swine, 2006), mediante idonei tamponi nasali, è certamente da privilegiare ed incentivare.

Le moderne tecniche di analisi genetica, inoltre, possono far luce su molti aspetti di natura epidemiologica (in questo caso specifico ci siamo chiesti ad esempio da dove sia arrivato il virus che ha determinato questo grave episodio, in quanto l'allevamento introduce solo pochi verri l'anno, o se i vicini laghi frequentati da uccelli selvatici o gli altri allevamenti vicini, tacchini e suini, possano rappresentare dei reali fattori di rischio) ed essere in grado di aiutare il veterinario nella identificazione dei fattori di rischio e nella conseguente applicazione di misure idonee al controllo aziendale della Influenza suina, la cui importanza nel nostro paese è spesso sottovalutata.

## BIBLIOGRAFIA

- Van Reeth K., Brown IH., Dürrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., Pospisil Z., Koch G.. (2008) "Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003". *Influenza and Other Respiratory Viruses*. May; 2 (3),99-105.
- Gradassi M., Sozzi M., Zanoni M., Salogni C., Cordioli P., Alborali L..(2009) "Il virus influenzale suino (SIV) e le principali associazioni virali, batteriche e da *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Atti XXXV Meeting annuale SIPAS*,229-239.
- Loeffen W.L.A., Kamp E.M. ed alt.(1999) "Survey of infectious agents involved in acute respiratory diseases in finishing pigs". *Vet.Rec* 145, 175-180.
- Guilmoto H.(2003) "La grippe dans l'espece porcine". *Atti del Congresso AFMVP 2003*, 5-12.
- Candotti P., Foni E., Leotti G., Joisel F., Longo S., Rota Nodari S.. (2003) "Serological prevalence for swine influenza virus in pigs between 3 and 15 weeks of age in italian farms: evaluation of a maternal antibody decay curve". *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging*

- pig diseases, Roma-29 Giugno/2 Luglio 2003, 272-273.
- Olsen C.W.,Brown I.H.,Easterday B.C.,Van Reeth K.,(2006) "Swine Influenza".Diseases of swine,8<sup>th</sup> edition,469-482.
- 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"(2010).Atti XXXVI Atti Sipas, 159-166.
- Barigazzi G, Foni E.,Chiapponi C., Leotti G., Longo S., Joisel F. (2003) "Use of a standard Kit for the diagnosis of respiratory viral infections in pigs". ". 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases, Roma-29 Giugno/2 Luglio 2003, 268-269.
- Madec et alt. (1992) "Updated according to 2008 economic data". INRA Prod.Animale, France, 5(2)149-16.
- Dréau D., Perrreul G., Laval A.. (2010) « Primo-infezione d'un cheptel de truie par le virus grippal dans une zone de faible densité porcine en 2010 ». Atti del Congresso AFMVP 2010,Parigi, 104.
- 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.
- 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.
- 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
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. Office International des Epizooties , Paris
- 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
- Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. (2002) Development a real time revers transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J. Clin. Microbiol. 40: 3256-3260.
- Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. (1999) Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect Mycoplasma hyopneumoniae from nasal swbs. J. Vet. Diagn. Invest. 11 (3):246-251
- J Vet Diagn Invest. 1999 May;11(3):246-51
- Ma W, Lager KM, Richt JA, Stoffregen WC, Zhou F, Yoon KJ. (2008) Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. J Vet Diagn Invest. 2008 Jul;20(4):440-7.
- Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2009) Studio preliminare sull'importanza del metodo d'estrazione del DNA per la titolazione di PCV2 con real-time PCR. Atti SIPAS 2009, pp 243-248.
- Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001) Evaluation of three RT-PCR assay for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples, International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology.

# DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI ENCEFALOMIOCARDITE IN UN ALLEVAMENTO SUINO

## DESCRIPTION OF AN OUTBREAK OF ENCEPHALOMYOCARDITIS IN A PIG HERD

CALISESI L.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>, BIANCHI M.<sup>2</sup>, SARLI G.<sup>4</sup>, GELMETTI D.<sup>3</sup>,  
MORANDI F.<sup>4</sup>, BONILAUDI P.<sup>3</sup>, DOTTORI M.<sup>3</sup>, MERIALDI G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Gruppo Amadori, San Vittore di Cesena (FC); <sup>2</sup> Merial Italia; <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; <sup>4</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna.

**Parole chiave:** encefalomiocardiocivirus, focolaio, indagini di laboratorio.

**Key words:** encephalomyocarditis virus, outbreak, laboratory investigations.

**Riassunto.** Viene descritto un focolaio di Encefalomiocardite da EMCV in un allevamento suino da riproduzione del Nord Italia. L'episodio ha coinvolto il sito 1 dell'azienda presso il quale sono allocate 3000 scrofe. Il focolaio è stato caratterizzato da elevata mortalità dei suinetti lattanti con assenza di sintomi clinici o con segnali aspecifici (anoressia, tremori, dispnea) osservabili per breve tempo prima della morte. La mortalità si è protratta per oltre un mese interessando complessivamente 1087 suinetti (15% degli animali sottoscrofa presenti). La mortalità intra-nidiata è risultata variabile da 0 a 100% La diagnosi di Encefalomiocardite da EMCV è stata effettuata tramite accertamenti necroscopici, biomolecolari (rt-PCR), istologici ed immuno-istochimici. Nelle scrofe non si è registrato un aumento delle problematiche riproduttive. Nel sito 2 dell'allevamento, nel quale sono trasferiti i soggetti svezzati a circa 28 giorni di vita, non è stato accertato nessuna caso di malattia riconducibile a EMCV e la mortalità si è mantenuta negli standard dell'allevamento. Indagini epidemiologiche retrospettive sulle scrofe (sierologia) e su alcuni ratti dell'allevamento non hanno fornito indicazioni utili alla comprensione della grande variabilità nel tasso di mortalità fra diverse nidiate né sull'origine dell'infezione.

**Abstract.** An outbreak of Encephalomyocarditis (EMCV) in a multisite pig herd of Northern Italy is reported. The disease has involved only site 1 of the herd, where 3000 sows are allocated. The outbreak was characterized by high mortality rates in suckling piglets. Sudden death was the most frequently observed occurrence, in some piglets it was possible to observe anorexia, trembling and dispnea. Mortality persisted for more than one month and a total of 1087 piglets (15% of all piglets) died. Mortality rate ranged from 0 to 100% in different litters. The diagnosis of EMCV infection was performed by necropsy, rt-PCR, histopathology and immunohistochemistry. The productive performance of sows did not result affected. In site 2, receiving piglets after weaning at 28 days of life, no cases of EMCV were reported and mortality was not increased during the outbreak. Retrospective epidemiological investigations on sows (serology) and rats did not lead to better understanding of the reasons of such high variability in mortality rates in different litters and of the source of the infection.

### INTRODUZIONE

Il virus della encefalomiocardite (EMCV) è un RNA-virus appartenente al genere *Cardiovirus* ed alla famiglia *Picornaviridae*. EMCV comprende al proprio interno molteplici ceppi caratterizzati da diversa virulenza ma che appartengono tutti al medesimo sierotipo

[Knowles *et al.*, 1998; Oberste *et al.*, 2009]. L'abilità di EMCV nel provocare infezioni in diverse specie animali ha portato a segnalazioni di focolai di encefalomiocardite in diversi giardini zoologici in Australia [Reddacliff *et al.*, 1997], negli Stati Uniti ed in Sud Africa [Grobler *et al.*, 1995], ed in Italia [Canelli *et al.*, 2010] dove la malattia è stata descritta in lemuri, scoiattoli, macachi, mandrilli, scimpanzé, ippopotami ed elefanti. Nella specie suina EMCV viene riconosciuto come causa di miocardite nei suinetti e di disordini riproduttivi nelle scrofe. Nei primi è descritta una forma fulminante, con morte improvvisa o con modici sintomi premonitori caratterizzati da eccitazione, ed una forma acuta dove si osservano manifestazioni cliniche con febbre, inappetenza, anoressia e paralisi progressiva. La mortalità è variabile e generalmente più elevata in suini di poche settimane d'età fino a 2 mesi di vita, dove la morte è attribuibile ad arresto cardiaco o ad aritmia acuta. Una certa percentuale di animali può presentare infezioni sub-cliniche e mostrare la presenza di anticorpi neutralizzanti nei confronti di EMCV. Le lesioni anatomopatologiche osservate alla necropsia sono caratterizzate da idrotorace, idropericardio e ascite, accompagnate da necrosi miocardiche rotondeggianti o allungate, di 2-10 mm di diametro. Le lesioni sono soprattutto evidenti a livello di epicardio ventricolare destro e tendono ad interessare il miocardio sottostante. I polmoni si presentano generalmente congesti ed edematosi, mentre le meningi possono mostrare una lieve congestione vasale o non presentare lesioni di rilievo. Il quadro istologico è caratterizzato da una miocardite con infiltrazione di cellule infiammatorie linfomononucleate, preceduta e accompagnata da alterazioni di tipo degenerativo-necrotico. Talvolta è possibile osservare una meningoencefalite, con presenza di manicotti perivasali di mononucleati e di degenerazione neuronale a carattere focale [Gelmetti *et al.*, 2006; Papaioannou *et al.*, 2003].

Nelle scrofe si osserva la comparsa di aborto a carattere sporadico generalmente nella parte terminale del periodo di gravidanza (107-111 giorni di gestazione), con aumento dei nati morti e dei feti mummificati. Le scrofe non presentano generalmente sintomi, eccezion fatta per la comparsa di febbre e disoressia. Fenomeni di ipofertilità, della durata di alcune settimane, possono persistere nelle scrofe che hanno abortito.

La diffusione del virus all'interno dell'allevamento suino è principalmente sostenuta da ratti o da altri roditori (contaminazione degli alimenti e dell'acqua con feci ed urine) e questo spiegherebbe anche il carattere stagionale della malattia. La trasmissione verticale e orizzontale suino-suino è una via altrettanto possibile ma, con ogni probabilità, meno efficace di quella precedentemente descritta [Knowles *et al.*, 1998; Koenen *et al.*, 1999]. Prove d'infezione sperimentale nel suino hanno dimostrato come la viremia abbia una durata di soli 3-4 giorni post-infezione e l'eliminazione del virus attraverso le feci persista per circa 7 giorni post-infezione [Dea *et al.*, 1991; Koenen *et al.*, 1994; Koenen and Vanderhallen, 1997].

Studi recenti dimostrano che EMCV è diffuso a livello europeo [Augustijn *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2006; Kluijvers *et al.*, 2006; Maurice *et al.*, 2005] così come a livello mondiale, dove gli isolamenti del virus dal suino e le positività sierologiche indicano l'importante diffusione del patogeno [Oberste *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 1993].

Scopo del presente lavoro è riportare i quadri clinici ed anatomopatologici nonché l'approccio diagnostico nell'ambito di un focolaio di EMCV in un allevamento suino situato in provincia di Brescia, approfondendo in particolare gli aspetti macroscopici e microscopici di maggiore rilievo ed utilità ai fini diagnostici differenziali.

## **MATERIALI E METODI**

### **Descrizione del focolaio**

L'episodio si è verificato nel sito 1 di un allevamento multisito, composto da circa 3000 scrofe in produzione, a rimonta esterna, che prevedeva lo spostamento dei suinetti a circa 28

giorni di vita in svezzamenti esterni. L'allevamento è situato nella zona Sud della provincia di Brescia, caratterizzata da una alta concentrazione di allevamenti suini, già teatro, alla fine degli anni novanta di numerosi focolai di EMCV [Maurice *et al.*, 2005].

Nell'allevamento gli interventi di derattizzazione sono effettuati con regolarità e il livello di infestazione da parte di ratti e topi era ed è relativamente basso. A partire dagli ultimi giorni di Settembre 2010, in concomitanza con l'abbassarsi della temperatura, è stata rilevata una mortalità improvvisa dei suinetti in sala parto che si è protratta fino alla seconda settimana di Novembre. La mortalità ha coinvolto i suinetti lattanti di ogni età ed ha avuto un andamento assai incostante nelle sale parto, nelle quali sono state osservate nidiate con perdite del 100% ed altre in cui i sintomi sono stati totalmente assenti. In particolare la mortalità si è inizialmente presentata in 4 stanze in cui si trovavano suinetti di circa 7 giorni di vita e poi si è diffusa a tutto il settore nell'arco di circa 15 giorni.

La sintomatologia clinica che precedeva la morte dei suinetti era molto scarsa e in alcuni soggetti è stato possibile osservare anoressia, tremori e dispnea ed una temperatura corporea superiore a 41°C. Tali sintomi erano più frequenti nei soggetti oltre i 14 – 21 giorni di vita, mentre nei suinetti deceduti durante la prima settimana la morte non era preceduta da alcuna forma clinica. In totale sono morti, con tale sintomatologia, 1087 animali corrispondenti al 15,6% dei suinetti presenti in allevamento. Il 40% dei soggetti deceduti avevano meno di 7 giorni di vita, il 30% tra gli 8 ed i 14 giorni, il 25% tra i 15 ed i 21 ed il 5% tra i 21 ed i 28 giorni.

Negli svezzamenti esterni dove gli animali provenienti dal sito 1 oggetto del focolaio e da altri siti 1 vengono movimentati a circa 28 giorni di vita, non sono stati osservati sintomi o mortalità riconducibili all'episodio precedentemente descritto.

E' inoltre opportuno segnalare che nel corso di questo focolaio non si sono verificati problemi di carattere riproduttivo nelle scrofe presenti in allevamento.

### **Indagini di laboratorio**

In concomitanza con i primi episodi di incremento della mortalità, le carcasse di 12 suinetti di cui 3 di 21 giorni di vita e 9 di 7 giorni d'età, sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e ad indagini di laboratorio.

L'esame necroscopico è stato eseguito secondo metodiche standardizzate presso il laboratorio e dal materiale patologico prelevato durante le necroscopie sono state condotte indagini batteriologiche e virologiche. Durante la necroscopia sono stati prelevati campioni di intestino da sottoporre ad indagini batteriologiche su agar sangue, sia in aerobiosi sia in anaerobiosi. Su campioni di rene e milza, prelevati da ogni soggetto, è stato eseguito l'esame batteriologico mediante metodiche standard. Sono stati inoltre prelevati diversi tessuti, organizzati in pool da 3, per l'esecuzione di indagini virologiche. In particolare, da ogni soggetto, sono stati prelevati la milza ed i polmoni per la ricerca del virus della PRRS tramite rt-PCR [Bonilauri *et al.*, 2003], il cuore per la ricerca di EMCV sempre tramite rt-PCR [Bakkali Kassimi *et al.*, 2002], il fegato ed il cervello per la ricerca del virus della Malattia di Aujeszky tramite PCR [Katz and Pedersen, 1992].

Campioni di milza, rene, fegato, stomaco, intestino, pancreas, linfonodi mesenterici, mediastinici e inguinali superficiali, cuore, polmone e cervello sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo a 5 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo le metodiche in uso.

Un'indagine immunostochimica è stata eseguita su sezioni di miocardio mediante anticorpo monoclonale 3E5 (diluito 1:500) che riconosce l'epitopo lineare della proteina capsidica VP1 di EMCV, impiegando ; come sistema di rivelazione il Novolink Polymer (Novocastra) e come cromogeno il Novared (Vector).

Quattro settimane dopo l'inizio della mortalità nei suinetti sono stati prelevati 20 campioni

di sangue su altrettante scrofe (di cui 10 da madri di nidiata colpite dalla grave forma clinica descritta e 10 da madri di nidiata in cui i suinetti non hanno presentato alcun sintomo durante il focolaio) da sottoporre alla ricerca di anticorpi anti-EMCV mediante test ELISA competitivo, sviluppato da IZSLER, basato sull'uso di anticorpi monoclonali, volto a verificare la presenza di anticorpi nei confronti di EMCV.

Un mese dopo l'inizio della mortalità in allevamento sono stati catturati 5 ratti dall'allevamento in cui si è verificato il focolaio e su questi è stata condotta la ricerca di EMCV tramite PCR su un pool di visceri costituito da intestino, milza, cuore e cervello.

## **RISULTATI**

L'esame anatomopatologico ha evidenziato lesioni ricorrenti negli animali esaminati caratterizzate da congestione pluriviscerale, da edema polmonare, da un versamento sieroso pleurico e pericardico. A livello del cuore erano evidenti rari focolai di colore biancastro osservabili sia a livello epicardio sia miocardico. Le lesioni macroscopiche apparivano più gravi nei soggetti di 3-4 settimane d'età, mentre negli animali fino ad una settimana di vita erano praticamente assenti.

Le indagini batteriologiche hanno fornito informazioni non significative mentre gli esami in PCR per la ricerca del virus della PRRS e della Malattia di Aujeszky sono costantemente risultati negativi. Tutti i campioni testati in PCR per la ricerca di EMCV sono risultati positivi.

Le indagini istopatologiche non hanno evidenziato lesioni di rilievo a livello di milza, rene, fegato, stomaco, intestino, pancreas, linfonodi mesenterici, mediastinici ed inguinali superficiali.

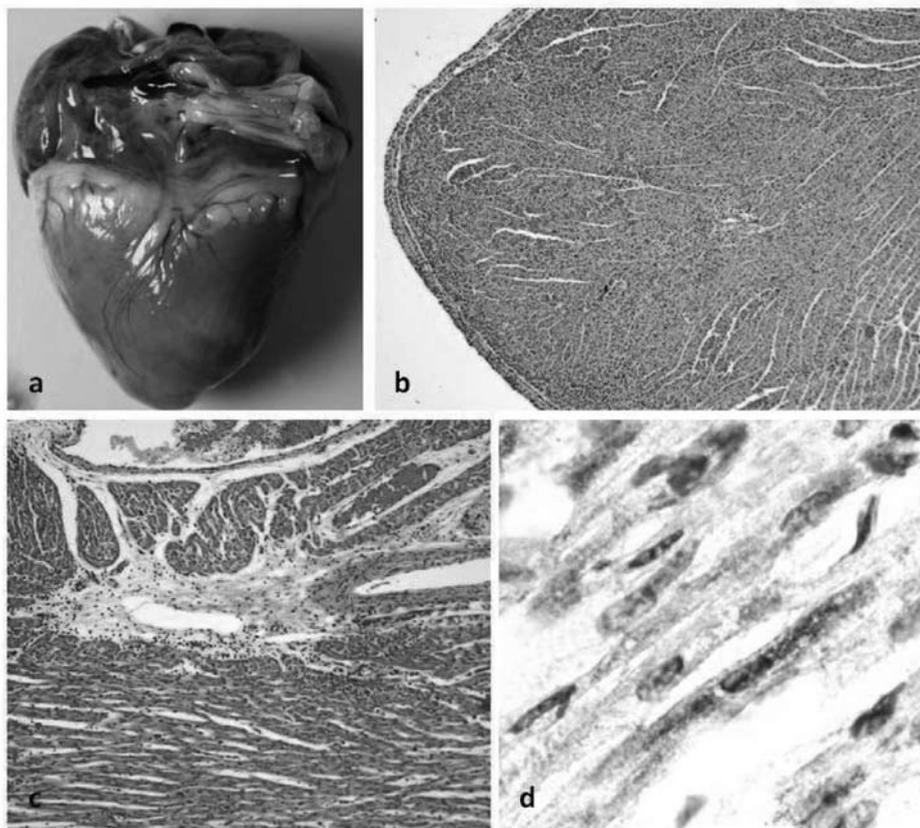
A livello cardiaco è stata evidenziata una miocardite interstiziale acuta da multifocale a diffusa abbinata ad una lieve epicardite. In sezioni istologiche del miocardio, ottenute trasversalmente a livello di massa ventricolare, in modo da comprendere pareti ventricolari e setto interventricolare, erano presenti focolai multipli e confluenti di flogosi con accumulo interstiziale di linfociti, macrofagi e neutrofili con nucleo carioretico localizzati prevalentemente nella parete ventricolare sinistra e nel setto interventricolare. L'infiltrato aveva distribuzione multifocale ed era presente anche a livello sub-epicardico e sub-endocardico. Nelle aree di flogosi le miofibre presentavano una perdita di definizione dei limiti cellulari accompagnata da frammentazione del citoplasma che appariva maggiormente eosinofilo (necrosi coagulativa). Le miofibre apparivano occasionalmente distanziate da moderato edema. A livello di epicardio erano presenti accumulo di fibrina, attivazione del mesotelio e non frequentemente infiltrato cellulare misto. La reazione immunoistochimica ha prodotto positività focale che, a forte ingrandimento, appariva localizzata a livello del citoplasma dei miocardiociti.

Il parenchima polmonare mostrava diffusa iperemia abbinata ad accumulo di materiale alveolare eosinofilo riferibile ad edema e talvolta ad emorragie interstiziali ed intralveolari. Con distribuzione multifocale alcuni alveoli mostravano presenza di materiale acidofilo di aspetto fibrillare riferibile a fibrina contestualmente al quale si rileva lieve desquamazione alveolare. Tale materiale era occasionalmente presente anche nell'interstizio peri-broncovascolare ed interlobulare. Era inoltre presente un diffuso ma debole infiltrato di mononucleati (linfociti e macrofagi) e rari granulociti neutrofili nell'interstizio. La pleura è localmente infiltrata da rari granulociti neutrofili.

Nessuna lesione istologica è stata riscontrata a livello di encefalo.

Le indagini sierologiche per EMCV hanno evidenziato 19 animali su 20 positivi, senza differenze tra scrofe la cui nidiata aveva subito perdite del 100% e scrofe i cui suinetti non avevano mostrato alcuna sintomatologia.

La ricerca di EMCV dai ratti catturati nell'allevamento hanno dato esito negativo in tutti i casi.



**Figura 1:** cuore di suinetto di 3 settimane di età. Aspetto macroscopico (a) di un focolaio di colore biancastro localizzato nella parete ventricolare sinistra. Miocardite interstiziale acuta in un focolaio superficiale, con associata reazione epicardica (b), e profondo (c). Reazione immunoistochimica positiva per EMCV nel citoplasma di miocardiociti (d)

**Figure 1:** heart of a 3 weeks old piglet. Macroscopic feature of a heart lesion (a). Interstitial acute myocarditis (b, c) and epicarditis (b). Immunohistochemistry to EMCV showing brown cytoplasmic stain in myocardiocytes (d).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stato descritto, in un allevamento intensivo situato in provincia di Brescia, un grave focolaio di malattia sostenuto da EMCV. L'identità del virus è stata dimostrata tramite una rt-PCR e l'evidenziazione delle caratteristiche lesioni istopatologiche miocardiche in abbinamento alla positività della reazione immunoistochimica, hanno ulteriormente confermato il risultato ottenuto a livello biomolecolare. In un lavoro del 2005 di Maurice *et al.* viene riportato come i focolai di encefalomiocardite nel suino si presentino in modo ricorrente in specifiche aree geografiche. Come già accennato l'allevamento oggetto del lavoro si trova in una zona geografica che nel corso degli ultimi 20 anni è stata teatro di numerosi focolai di EMCV e che può quindi essere considerata endemica. Come già descritto

nella parte introduttiva, i roditori si comporterebbero da serbatoio dell'infezione e sarebbero la principale causa di introduzione o reintroduzione del virus in allevamento. In tal modo la migrazione di topi e ratti all'interno degli allevamenti suini per carenza di cibo o l'aumento della popolazione di roditori in una determinata area, favorirebbero la diffusione di EMCV dai roditori ai suini e spiegherebbe il carattere stagionale dei focolai osservati in diversi paesi europei. Il risultato ottenuto nel presente lavoro dall'indagine in PCR per EMCV, sui tessuti prelevati da ratti catturati all'interno dell'allevamento, necessita di ulteriore approfondimento, sia per l'esiguità del campione sia per il fatto che il campionamento è stato effettuato diverse settimane dopo la comparsa della mortalità nei suinetti.

La gravità della forma clinica osservata è imputabile a diversi fattori, dipendenti sia dall'ospite, sia dal ceppo di EMCV responsabile del focolaio. Per quanto riguarda il primo punto, nel caso descritto in questo lavoro, il ceppo di EMCV una volta entrato nell'allevamento ha trovato una popolazione estremamente recettiva, in molti casi probabilmente priva di una protezione immunitaria nei confronti di EMCV. In questo senso è stata descritta in letteratura una maggior incidenza della forma clinica nei suinetti lattanti, dipendente da una elevata suscettibilità del tessuto cardiaco di questi animali, che può essere aggravata dall'assenza di una solida immunità protettiva colostrale [Maurice *et al.*, 2005]. Esiste inoltre una diversa patogenicità e tropismo tissutale tra i differenti ceppi di EMCV. In questo contesto, in seguito ad infezione da EMCV possono essere osservati quadri anatomo-patologici differenti, in certi casi con assenza delle tipiche lesioni macro e microscopiche a livello di miocardio [Dea *et al.*, 1991].

Come evidenziato nei risultati, tutte le scrofe sottoposte ad indagini sierologica per EMCV sono risultate positive, eccetto una. I risultati dell'indagine sierologica si basano su un unico prelievo eseguito in fase convalescente che non permette di discriminare tra sier conversionsi e positività pregresse. Nonostante questo è possibile ipotizzare che le nidiate che non hanno presentato sintomatologia fossero protette da una solida immunità passiva, trasmessa con il colostro da scrofe già sieropositive per precedente esposizione ad EMCV. Per contro le nidiate che hanno presentato la sintomatologia clinica descritta provenivano probabilmente da scrofe sieronegative al momento dell'introduzione di EMCV in allevamento. Indagini sierologiche eseguite in diversi paesi europei hanno evidenziato elevate sieroprevalenze per EMCV sia all'interno che all'esterno di aree considerate endemiche, dove la forma sub-clinica dell'infezione da EMCV è evento tutt'altro che raro [Maurice *et al.*, 2005].

L'encefalomiocardite sostenuta da EMCV, come dimostrato nel caso clinico riportato, è da considerarsi una patologia che in determinate condizioni è in grado di produrre gravissime perdite nell'allevamento suino e per la quale ulteriori studi sono necessari per arrivare ad una esaustiva comprensione dei numerosi interrogativi epidemiologici non ancora chiariti.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Augustijn M., Elbers A.R., Koenen F., Nielen M. (2006). Estimation of seroprevalence of encephalomyocarditis in Dutch sow herds using the virus neutralization test. *Tijdschr Diergeneeskd* 15; 131 (2): 40-44.
- Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002). Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 101 (2002) 197-206.
- Bakkali K., Madec F., Guy M., Boutrouille A., Rose N., Cruciere C. (2006). Serological survey of encephalomyocarditis virus infections in pigs in France. *Vet Rec* 14; 159 (16): 511-514.
- Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi 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.
- Canelli E., Luppi A., Lavazza A., Lelli D., Sozzi E., Martin A.M., Gelmetti D., Pascotto E., Sandri C., Magnone W., Cordioli P. (2010). Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. *Virology* 18;7:64.
  - Dea S.A., Bilodeau R., Martineau G.P. (1991). Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. *Arch Virol.* 117; 121-128.
  - Gelmetti D., Meroni A., Brocchi E., Koenen F., Cammarata G. (2006). Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. *Vet Res.* 2006 Jan-Feb;37(1):15-23.
  - Grobler D.G., Raath J.P., Braack L.E., Keet D.F., Gerdes G.H., Barnard B.J., Kriek N.P., Jardine J., Swanepoel R. (1995). An outbreak of encephalomyocarditis-virus infection in free-ranging African elephants in the Kruger National Park. *Onderstepoort J Vet Res.* 1995 Jun;62(2):97-108.
  - 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 187-195 *Biologicals* 20,187-195.
  - Kluivers M., Maurice H., Vyt P., Koenen F., Nielen M. (2006). Transmission of encephalomyocarditis virus in pigs estimated from field data in Belgium by means of  $R_0$ . *Vet Res.* 37; 757-766.
  - Knowles N.J., Dickinson N.D., Wilsden G., Carra E., Brocchi E., De Simone F. (1998). Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. *Virus Res* 57: 53-62.
  - Koenen F., De Clercq K., Lefebvre J., Strobbe R. (1994). Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate. *Vet Microbiol.* 39: 111-116.
  - Koenen F., Vanderhallen H. (1997). Comparative study of the pathogenic properties of a Belgium and Greek EMCV isolate for sows in gestation. *Zentralbl Veterinarmed B* 44: 281-286.
  - Koenen F., Vanderhallen H., Castryck F., Miry C. (1999). Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium. *Zentralbl Veterinarmed B.* May; 46 (4): 217-231.
  - Maurice H., Nielen M., Brocchi E., Nowotny N., Bakkali Kassimi L., Billinis C., Loukaides P., O'Hara R.S., Koenen F. (2005). The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001. *Epidemiol Infect* 133; 547-557.
  - Oberste S.M., Gotuzzo E., Blair P., Nix A.W., Ksiazek G.T., Comer J.A., Rollin P., Goldsmith S., Olson J., Kochel T.J. (2009). Human Febrile Illness Caused by Encephalomyocarditis Virus Infection, Peru. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 15.
  - Papaioannou N., Billinis C., Psychas V., Papadopoulos O., Vlemmas I. (2003). Pathogenesis of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets during the viraemia phase: a histopathological, immunohistochemical and virological study. *J Comp Pathol.* 129 (2-3): 161-168.
  - Reddacliff L.A., Kirkland P.D., Hartley W.J., Reece R.L. (1997). Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J Zoo Wildl Med.* 1997 Jun;28(2):153-7.
  - Zimmerman J., Schwartz K., Hill H.T., Meetz M.C., Simonson R., Carlson J.H. (1993). Influence of dose and route on transmission of encephalomyocarditis virus in swine. *J Vet Diagn Invest* 5: 317-321.

# SUPPLEMENTAZIONE DEI MANGIMI CON MINIME DOSI DI SELENIO ORGANICO: EFFETTO SULLE PRESTAZIONE DEI SUINETTI

## FEED SUPPLEMENTATION WITH MINIMAL DOSES OF ORGANIC SELENIUM: EFFECT ON PIGLET PERFORMANCES

BARICCO GIUSEPPE \*, PIOVANO ROBERTO \*

\* *Medico Veterinario Libero Professionista, TORINO*

**Parole chiave:** selenio, suinetti, prestazioni, nutrigenomica

**Key words:** selenium, piglets, performances, nutrigonomics

**Riassunto.** Nel presente lavoro una aggiunta di basse dosi di selenio organico (0,3 ppm, SelPlex™ Alltech Inc.) in aggiunta ad altri 0,3 ppm da selenito di sodio già presenti nel mangime nel mangime di suinetti svezzati ha determinato un miglioramento dell'indice di conversione alimentare del 5% (NS), un incremento del consumo alimentare dell'8% (NS). Combinato effetto di questi due parametri è stato un miglioramento dell'accrescimento giornaliero del 12% (P=0,05).

La prova ha riguardato 40 suinetti di controllo e 40 di test, per 28 giorni post-svezzamento. Si conclude che, essendo difficile attribuire un significato nutrizionale alla modesta dose aggiunta, occorre guardare ad altre possibili spiegazioni, tra cui l'ipotesi nutrigenomica.

**Summary:** *In the present work a supplementation with low doses of organic selenium (0,3 ppm, SelPlex™, Alltech Inc.) added on other 0,3 ppm already present in the feed (from inorganic selenite) in weaned piglets has produced an improvement of the feed conversion rate of 5% (NS), and an increase of feed intake of 8% (NS). Combined effect of those two parameters has been an increase of average daily gain of 12% (P=0,05). The test has involved 40 piglets for control and 40 for test groups for 28 days after weaning. It is concluded that, being difficult to attribute a full nutritional meaning to the small dose added, then it would have to be looked to other possible explanations, between which the nutrigonomic hypothesis could be taken in account.*

### INTRODUZIONE

Il selenio svolge un ruolo fondamentale del mantenimento dello stato antiossidante dell'organismo, interagendo in modo sinergico tanto con la vitamina E quanto con gli altri fattori antiossidanti presenti nella dieta. Sono recentemente apparse sul mercato degli additivi forme di selenio altamente biodisponibili, per le quali si ipotizza un coefficiente di incremento della biodisponibilità rispetto al sodio selenito nell'ordine di  $K > 10$ : contemporaneamente, per le forme organiche di selenio, le Ditte produttrici mostrano anche una marcata riduzione della tossicità rispetto alla fonte inorganica. I valori plasmatici del selenio sono particolarmente bassi nei suinetti, specie se messi a confronto con quelli delle loro madri (Siversten et al., 2007). Ne deriva un ovvio interesse a valutare l'effetto della somministrazione di selenio ad elevata biodisponibilità nel post-svezzamento. Il selenio è ammesso in nutrizione animale fino ad un contenuto massimo sul totale della dieta di 0,5 mg/kg. Assumendo un contenuto degli ingredienti vicino allo zero (cosa che in realtà non è, si veda ad esempio la valutazione degli ingredienti contenuta nei Nutrients Requirements of Swine - 1998 - , online at [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6016&page=129](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6016&page=129)), la maggioranza dei mangimi per suinetti viene integrata con dosi di selenio che variano da 0,2 a 0,4 ppm di Se.

## MATERIALI E METODI

Si è valutato in questo esperimento l'effetto dell'aggiunta di ulteriori 0,3 ppm di selenio da fonte organica (SelPlex™, Alltech Inc. Nicholasville, USA) oltre agli 0,3 ppm di origine inorganica già forniti routinariamente attraverso il mangime come unica variabile alimentare sulle prestazioni zootecniche di suinetti in post svezzamento.

Selplex è stato aggiunto ad un mangime commerciale per suini allo svezzamento di prima fase (18,04% PG, 3450 kcal ED, 1,3% Lys), alla dose di 150 gr/tonnellata, così da portare il livello di selenio aggiunto dagli originali 0,3 ppm tutti da selenito di sodio a 0,6 ppm, in parte inorganici ed in parte organici. Tale livello eccede leggermente la soglia attualmente ammessa per i mangimi (0,5 ppm).

Il mangime così ottenuto è stato confrontato con un lotto di controllo prodotto immediatamente in sequenza al primo, con la formulazione originaria.

Le due formulazioni confrontate erano pertanto in tutto uguali, salvo nell'aggiunta del Selplex nel lotto di sperimentazione.

La formulazione del mangime è indicata in tabella:

**Tabella 1.** Formulazione del mangime utilizzato

<i><b>Ingrediente</b></i>	<i><b>Quantità %</b></i>
MAIS IBRIDO	22,26
FRUMENTO	24,00
ORZO FRANCESE	20,00
SOIA PROTEICA 48%	7,50
NUPRO Alltech (citoplasma di <i>S. cerevisiae</i> )	2,50
ARINGHE L.T.	7,50
SIERO DOLCE	5,00
SIERO GRASSATO 50%	2,50
LATTE PER VITELLI	1,26
OLIO SOIA	2,30
CALCIO CARBONATO	0,50
FOSFATO MONOCALCICO	0,80
SODIO CLORURO	0,30
L-LISINA	0,40
MHA	0,20
COLINA 50%	0,08
PREMIX	2,50
IDROACID LF (68f+22l)	0,40
<b>Totale</b>	<b>100</b>
<i><b>ANALISI CALCOLATA</b></i>	
<i><b>Proteine %</b></i>	<i><b>18,04%</b></i>
<i><b>DE Kcal/kg</b></i>	<i><b>3450</b></i>
<i><b>Lisina %</b></i>	<i><b>1,32%</b></i>
<i><b>Met+Cist %</b></i>	<i><b>0,79%</b></i>
<i><b>Treonina %</b></i>	<i><b>0,85%</b></i>
<i><b>Triptofano %</b></i>	<i><b>0,25%</b></i>

Questi mangimi sono stati somministrati a due gruppi di suinetti svezzati omogenei per sesso, peso e conformazione.

I suinetti sono stati divisi in box a gruppi di 5 suini per unità.

Sono stati pesati per box nel momento stesso in cui si sono formati i raggruppamenti per totale di 40 suini per il gruppo controllo (CTRL) e di 40 suini per il gruppo SelPlex (SP) suddivisi in otto boxes per il gruppo CTRL ed altrettanti per il gruppo SP.

Si sono misurati:

- Il peso degli animali su base per box, con elaborazione statistica (ANOVA one way)
- Il consumo di mangime - e di conseguenza l'indice di conversione alimentare - per box con elaborazione statistica (ANOVA one way).
- La mortalità e le patologie eventualmente mostrate dagli animali

La prova ha avuto una durata media di 28,5 giorni.

## RISULTATI

I risultati osservati sono stati i seguenti:

**Tabella 2. Risultati zootecnici.**

	CTRL	SelPlex	P
Peso medio suini a D 0 kg	7,700	7,734	--
Peso medio suini a D 28,5 kg	19,676	21,311	--
I.P.G. kg.	0,42	0,469	P = 0,05
Consumo di mangime/capo	24,50	26,52	--
I.C.A.	2,046	1,953	NS (P = 0,16)

Nel corso di tutta la prova non si sono avuti episodi di mortalità, e non si sono osservate differenze marcate tra i due gruppi sperimentali nelle manifestazioni patologiche.

## DISCUSSIONE

In questa prova l'aggiunta nel mangime di selenio organico (0,3 ppm) oltre a quello inorganico (pari quantità) normalmente presente nella integrazione ha determinato nei suinetti un effetto sulla resa alimentare, migliorata fino ad un ICA di 1,95 nel gruppo SP rispetto al 2,05 del controllo (+5%).

In termini assoluti, trattandosi di alimenti in post-svezzamento, è ben evidente che sono valori non di eccellenza, tuttavia la prova è stata volutamente svolta in un allevamento con condizioni ambientali non perfette, allo scopo di evidenziare con più facilità un eventuale effetto del trattamento alimentare. Il miglioramento sull'indice di conversione è stato solo numerico, senza raggiungere la soglia della significatività statistica (P = 0,16)

Per quanto riguarda l'ingestione nel gruppo SP si è verificato un aumento, con un consumo medio di mangime per capo pari a 26,52 kg nel gruppo SP, rispetto ai 24,50 kg del gruppo CTRL (+8%).

L'incremento ponderale giornaliero dei suinetti mostra l'effetto combinato di queste due rilevazioni: aumentando il consumo di mangime e migliorandone contemporaneamente l'efficienza di trasformazione si ottiene un risultato complessivamente abbastanza brillante, con 0,47 kg di IPG per il gruppo SP e di 0,42 kg per i controlli (+12%). Tali valori sono borderline per quanto riguarda la significatività statistica, attestandosi su un P = 0,05.

## CONCLUSIONI

E' difficile sostenere un effetto tipicamente "nutrizionale" (legato quindi al soddisfacimento più o meno completo di un fabbisogno nutritivo) di una semplice aggiunta di 0,3 ppm di selenio organico, per quanto di elevata e provata qualità (SelPlex™): gli effetti sulle prestazioni osservati in questo esperimento, confermati da altri lavori (*Mahan et al., 1999*) ma anche smentiti da altre esperienze (*Svoboda et al., 2009*) sembrano essere correlabili ad un effetto di tipo ormonale piuttosto che tipicamente nutrizionale.

Alcune fonti di selenio organico, infatti, sarebbero in grado di eccitare o deprimere specifiche espressioni geniche degli animali allevati, in questo differenziandosi in modo specifico da prodotti congeneri.

Questo tipo di effetto viene definito "nutrigenomico", e rappresenta, in effetti, una delle frontiere più intriganti della moderna nutrizione animale. Poco se ne sa e pochi sono gli studi pubblicati, ma molti di essi riguardano esattamente il ruolo "nutrigenomico" del selenio (*Hesketh, 2008*).

La nutrigenomica in medicina umana è una scienza tipicamente orientata all'individuo, ed allo studio delle interazioni che si osservano tra le sue proprie espressioni geniche ed il consumo di varie sostanze alimentari: è quindi una scienza "ad personam".

La sostanziale omogeneità dal punto di vista genetico delle vaste popolazioni di animali allevati in condizioni industriali fornisce una giustificazione allo studio della nutrigenomica negli allevamenti, la quale altrimenti potrebbe apparire come una chiara contraddizione in termini.

Un ringraziamento alla Az. Agr. Piovano Guido di Airali, Chieri (TO) per il supporto fornito.

## BIBLIOGRAFIA

Sivertsen T, Vie E, Bernhoft A, Baustad B. (2007) "Vitamin E and selenium plasma concentrations in weanling pigs under field conditions in Norwegian pig herds". *Acta Vet Scand.* Jan 3;49:1

Mahan D. C., Cline T. , Richert B. (1999) "Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality" *J Anim Sci* 77: 2172-2179

Svoboda M, Saláková A, Fajt Z, Ficek R, Buchtová H, Drábek J. (2009) "Selenium from Se-enriched lactic acid bacteria as a new Se source for growing-finishing pigs" *Pol J Vet Sci.* 12(3): 355-6

Hesketh J. (2008) "Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics" *Annual Review of Nutrition* Vol. 28: 157-177

# SUPPLEMENTAZIONE DEI MANGIMI CON MINIME DOSI DI SELENIO ORGANICO: EFFETTO SULLE PRESTAZIONE DI SUINI IN FINISSAGGIO

## FEED SUPPLEMENTATION WITH MINIMAL DOSES OF ORGANIC SELENIUM: EFFECT ON FINISHING PIGS PERFORMANCES

BARICCO GIUSEPPE \*, PIOVANO ROBERTO \*

\* *Medico Veterinario Libero Professionista, TORINO*

**Parole chiave:** selenio, suini, prestazioni, nutrigenomica

**Key words:** selenium, swine, performances, nutrigenomics

**Riassunto:** Nel presente lavoro una aggiunta di basse dosi di selenio organico (0,2 ppm, SelPlex™ Alltech Inc.) in aggiunta ad altri 0,3 ppm da selenito di sodio già presenti nel mangime di suini in finissaggio “italiano” (tra i 130 ed i 170 kg di p.v.) ha determinato un miglioramento dell’indice di conversione alimentare del 5% (P= 0,01) ed un decremento del consumo alimentare ad libitum dell’8,5% (P=0,01).

La prova ha riguardato 9 suini di controllo e 9 di test pesati individualmente, per 45 giorni prima della macellazione. Si conclude che, essendo difficile attribuire un significato nutrizionale alla modesta dose aggiunta, occorre guardare ad altre possibili spiegazioni, tra cui l’ipotesi nutrigenomica.

**Summary:** *In the present work a supplementation with low doses of organic selenium (0,2 ppm, SelPlex™, Alltech Inc.) added on other 0,3 ppm already present in the feed (from inorganic selenite) in finishing “italian” pigs (between 130 and 170 kg b.w.) has produced an improvement of the feed conversion rate of 5% (P=0,01), and a decrease of “ad libitum” feed intake of 8,5 % (P=0,01). The test has involved 9 pigs for control and 9 for test individually weighed for 45 days before slaughtering. It is concluded that, being difficult to attribute a full nutritional meaning to the small dose added, then it would have to be looked to other possible explanations, between which the nutrigenomic hypothesis could be taken in account.*

### INTRODUZIONE

Il selenio svolge un ruolo fondamentale del mantenimento dello stato antiossidante dell’organismo, interagendo in modo sinergico tanto con la vitamina E quanto con gli altri fattori antiossidanti presenti nella dieta.

Sono recentemente apparse sul mercato degli additivi forme di selenio altamente biodisponibili, per le quali si ipotizza un coefficiente di incremento della biodisponibilità rispetto al sodio selenito nell’ordine di  $K \Rightarrow 10$ : contemporaneamente, per le forme organiche di selenio, le Ditte produttrici mostrano anche una marcata riduzione della tossicità rispetto alla fonte inorganica.

Il selenio è ammesso in nutrizione animale fino ad un contenuto massimo sul totale della dieta di 0,5 mg/kg. Assumendo un contenuto degli ingredienti vicino allo zero (cosa che in realtà non è, si veda ad esempio la valutazione degli ingredienti contenuta nei Nutrients Requirements of Swine – 1998 - , online at [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6016&page=129](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6016&page=129)), la maggioranza dei mangimi per suini viene integrata con dosi di selenio che variano da 0,2 a 0,4 ppm di Se.

Nella fase di finissaggio dei suini pesanti italiani (quindi nel range di peso tra i 130 ed i 170 kg) si osserva una drastica riduzione degli indici di performances, in particolare per ciò che riguarda la resa alimentare. Pur essendo oggi possibile concludere (nelle migliori condizioni alimentari, di genotipi e di ambiente) dei cicli di ingrasso (25 -170 kg) con conversioni intorno a 3,5/3,3,

anche in questi casi la fase di finissaggio è critica sul piano delle trasformazioni alimentari. Inoltre i dati sperimentali specifici rispetto a questa fase di allevamento sono pochi, perché le operazioni di pesatura dei suini di peso intorno ai 120-130 kg sono ovviamente indaginose, costose e laboriose, e quindi ben pochi allevatori sono disposti a verificare in modo mirato cosa accade, per esempio a livello alimentare, in quella specifica fase di allevamento.

Inoltre, eventuali fattori alimentari di promozione della crescita impiegati in questa fase devono rispondere al principio della economicità, stante l'elevato consumo di mangime dei suini in finissaggio: per questo si è valutato l'effetto di una minima dose di selenio in forma organica aggiunto ad un mangime ordinario per finissaggio, e fornito a soggetti ibridi di non particolare pregio genetico.

I capi implicati sono stati pochi, a causa delle difficoltà di pesatura sopra accennate, ma sono stati pesati individualmente, consentendo, almeno per alcuni parametri, una elaborazione statistica dei risultati.

### **MATERIALI E METODI**

Si è valutato in questo esperimento l'effetto dell'aggiunta di ulteriori 0,2 ppm di selenio da fonte organica (SelPlex™, Alltech Inc. Nicholasville, USA) oltre agli 0,3 ppm di origine inorganica già forniti routinariamente attraverso il mangime come unica variabile alimentare sulle prestazioni zootecniche di suini in finissaggio.

Selplex è stato aggiunto ad un mangime commerciale per suini in finissaggio (15,5% PG, 3250 kcal ED, 0,8% Lys), alla dose di 100 gr/tonnellata, così da portare il livello di selenio aggiunto dagli originali 0,3 ppm tutti da selenito di sodio a 0,5 ppm, in parte inorganici ed in parte organici. Tale livello eguaglia la soglia attualmente ammessa per i mangimi (0,5 ppm).

Il mangime così ottenuto è stato confrontato con un lotto di controllo prodotto immediatamente in sequenza al primo, con la formulazione originaria.

Le due formulazioni confrontate erano pertanto in tutto uguali, salvo nell'aggiunta del Selplex nel lotto di sperimentazione.

La formulazione del mangime è indicata in tabella:

**Tabella 1.** Formulazione del mangime utilizzato

<b><i>Ingrediente</i></b>	<b><i>Quantità %</i></b>
MAIS IBRIDO	45,00
FRUMENTO TENERO	10,00
CRUSCHELLO TENERO	10,00
FARINACCIO DURO	5,00
ORZO FRANCESE	10,00
SOIA NORMALE 44%	15,80
SEGO	1,40
CALCIO CARBONATO	1,30
FOSFATO BICALCICO	0,30
SODIO CLORURO	0,30
SODIO BICARBONATO	0,25
LISINA LIQUIDA 50%	0,25
COLINA 75%	0,05
SUIBASE 0.25% PX VIT OLIGO	0,25
FITASI 500 FTU	0,10
<b>Totale</b>	<b>100</b>
<b><i>ANALISI CALCOLATA</i></b>	
<b><i>Proteine %</i></b>	<b><i>15,50%</i></b>
<b><i>DE Kcal/kg</i></b>	<b><i>3250</i></b>
<b><i>Lisina %</i></b>	<b><i>0,80%</i></b>

Le due formulazioni confrontate erano pertanto in tutto uguali, salvo nell'aggiunta del Selplex nel lotto di sperimentazione.

Questi mangimi sono stati somministrati a due gruppi di suini in fase di finissaggio [(LW x LDR) x Duroc], omogenei per sesso, peso e conformazione, pesati individualmente a partire dal momento in cui sono stati formati i gruppi per la sperimentazione, per un totale di 9 suini per il gruppo CTRL e di 9 suini per il gruppo Selplex.

Al fine di evidenziare in maniera più chiara eventuali effetti nutrizionali, il mangime è stato fornito a volontà.

I suini sono divisi in 6 box a gruppi di 3 per boxes.

Si sono misurati:

- Il peso degli animali su base individuale, con elaborazione statistica (ANOVA one way)
- Il consumo di mangime - e di conseguenza l'indice di conversione alimentare - per box (per un totale di 6 boxes) con elaborazione di tipo statistico.
- La mortalità e le patologie eventualmente mostrate dagli animali

La prova ha avuto una durata di 45 giorni.

## RISULTATI

I risultati osservati sono stati i seguenti:

**Tabella 2.** Risultati zootecnici.

	CTRL	SELPLEX
Peso medio suini a D0 kg	134,22 kg	132,88 kg
Peso medio suini a D45 kg	176,11 kg	173,44 kg
I.P.G. kg.	0,93 kg	0,90 kg
Consumo di mang./giorno kg/capo	4,428 a	4,083 b
I.C.A.	4,75 a	4,53 b
Resa del mangime %	21,05 a	22,07 b

Lettere differenti indicano una differenza statisticamente significativa per  $P < 0,01$ .

(Anova one way, Microsoft Excel)

## DISCUSSIONE

In questa prova l'aggiunta di selenio organico nella formulazione di un mangime di finissaggio (in quantità tale da apportare ulteriori 0,2 ppm di Se oltre agli 0,3 già presenti in forma inorganica) ha determinato nei suini in finissaggio un effetto di miglioramento sulla resa (22,07% del gruppo Selplex rispetto ai 21,05% del controllo, pari ad un ICA rispettivamente di 4,53 e di 4,75).

L'aggiunta di selenio organico ha determinato una riduzione nell'assunzione alimentare (mangime fornito *ad libitum*), con un consumo giornaliero per il gruppo Selplex di 4,08 kg, rispetto ai 4,43 del gruppo di controllo. L'incremento ponderale giornaliero medio, pur essendo numericamente superiore per il gruppo di controllo (0,93 kg al giorno VS 0,90), non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa.

Pur in una situazione non del tutto chiara, appare comunque meritevole di ulteriori verifiche la possibilità di utilizzare una minima dose di selenio organico come promotore di resa alimentare specifico per la fase di finissaggio dei suini: infatti con un costo limitato (intorno agli 0,12 €/qle), abbondantemente ripagato dal miglioramento dell'indice di conversione alimentare, si sommerebbero a costo zero tutti gli ulteriori vantaggi derivanti dalla ottimale sinergia nutrizionale tra Vitamina E e selenio, con riferimento particolare alla qualità del

muscolo ed alla shelf life delle parti di carcassa destinate alla macelleria.

La particolare situazione italiana, con i suoi pesi di macellazione ed i relativi costi alimentari, non disgiunta dalla specificità di alta gamma delle proprie lavorazioni salumiere, rende questa soluzione nutrizionale particolarmente interessante ed adatta al mercato.

## **CONCLUSIONI**

E' difficile sostenere un effetto tipicamente "nutrizionale" (legato quindi al soddisfacimento più o meno completo di un fabbisogno nutritivo) di una semplice aggiunta di 0,2 ppm di selenio organico, per quanto di elevata e provata qualità (SelPlex™): gli effetti sulle prestazioni osservati in questo esperimento, confermati da altri lavori (*Mahan et al., 1999*) ma anche smentiti da altre esperienze (*Svoboda et al., 2009*) sembrano essere correlabili ad un effetto di tipo ormonale piuttosto che tipicamente nutrizionale.

Alcune fonti di selenio organico, infatti, sarebbero in grado di eccitare o deprimere specifiche espressioni geniche degli animali allevati, in questo differenziandosi in modo specifico da prodotti congeneri.

Questo tipo di effetto viene definito "nutrigenomico", e rappresenta, in effetti, una delle frontiere più intriganti della moderna nutrizione animale. Poco se ne sa e pochi sono gli studi pubblicati, ma molti di essi riguardano esattamente il ruolo "nutrigenomico" del selenio (*Hesketh, 2008*).

La nutrigenomica in medicina umana è una scienza tipicamente orientata all'individuo, ed allo studio delle interazioni che si osservano tra le sue proprie espressioni geniche ed il consumo di varie sostanze alimentari: è quindi una scienza "ad personam".

La sostanziale omogeneità dal punto di vista genetico delle vaste popolazioni di animali allevati in condizioni industriali fornisce una giustificazione allo studio della nutrigenomica negli allevamenti, la quale altrimenti potrebbe apparire come una chiara contraddizione in termini.

Un ringraziamento alla Az. Agr. Piovano Guido di Airali, Chieri (TO) per il supporto fornito.

## **BIBLIOGRAFIA**

Mahan D. C., Cline T. , Richert B. (1999) "Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality" *J Anim Sci* 77: [2172-2179](#)

Svoboda M, Saláková A, Fajt Z, Ficek R, Buchtová H, Drábek J. (2009) "Selenium from Se-enriched lactic acid bacteria as a new Se source for growing-finishing pigs" *Pol J Vet Sci.* 12(3): 355-6

Hesketh J. (2008) "Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics" *Annual Review of Nutrition* Vol. 28: [157-177](#)

# CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEI CEPPI DI AUJESZKY ISOLATI IN ITALIA TRA IL 2000 E IL 2010.

## GENOMIC CHARACTERIZATION OF PSEUDORABIES VIRUS ISOLATED IN ITALY IN 2000 - 2010.

CATELLA A., MORENO A., SOZZI E., LELLI D., BONIOTTI B., ALBORALI L., LUPPI A., NIGRELLI D., FONTANA R., CORDIOLI P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Brescia*

**Parole chiave:** PRV; geni gC e gE; caratterizzazione genomica; Italia

**Key words:** PRV; gC and gE genes; genomic characterization; Italy

**Riassunto.** Questo studio riporta la caratterizzazione genomica, basata sul sequenziamento parziale dei geni UL44 e US8 che codificano rispettivamente le glicoproteine gC e gE, di un totale di 36 ceppi del virus della pseudorabbia isolati in Italia dal 2000 al 2010. Ventinove ceppi sono stati isolati da suini e 7 da cani. L'analisi filogenetica ha evidenziato che 26/29 ceppi suini appartengono per il gene gC e il gE al cluster B che raggruppa la maggior parte di ceppi PRV recentemente isolati da suini in Europa ed America. Un solo ceppo suino presenta una elevata correlazione con i ceppi PRV isolati negli anni 70-80, attualmente quasi scomparsi nella popolazione suina ma prevalenti nei cinghiali. I due ceppi suini restanti sono correlati ai ceppi PRV storici per quanto riguarda il gene gC mentre il gene gE clusterizza con i ceppi PRV recenti. Dai 7 ceppi isolati da cane, 5 ceppi provengono da cani da caccia e presentano una elevata percentuale di omologia con i ceppi isolati da cinghiale. Due ceppi isolati da un cane non utilizzati per le attività venatorie risultano correlati con i ceppi suini. I risultati di questo studio permettono di approfondire le caratteristiche genomiche dei ceppi circolanti nella popolazione suina e nei cinghiali, evidenziando una netta distinzione tra i ceppi isolati da cani adibiti ad attività venatoria, e quindi riconducibili al cinghiale, da quelli isolati da suini domestici.

**Summary.** This study reports the genomic characterization, based on partial sequencing of the UL44 and US8 genes, of 36 PRV strains isolated in Italy during 2000-2010. Out of these, 29 strains were isolated on swine farms and 7 originated from dogs. Phylogenetic analysis revealed that 26/29 swine strains were placed in cluster B in both phylogenetic trees of the UL44 and US8 genes and were closely related to the recent PRV strains isolated in Europe and America. One swine strain showed high homology to the old PRV strains isolated in the 70's and 80's. In the last twenty years, the presence of these strains are drastically reduced in the swine population whereas is prevalent in wild boars. The last two swine strains exhibited interesting features. The gC gene of these strains was closely related to the old PRV strains but their gE gene showed a high homology to the recent PRV strains. Regarding dog isolates, five of these were isolated from hunting dogs and exhibited a great correlation with PRV strains circulating in wild boars. The other two isolates were closely related to swine PRV strains and originated from dogs not used for hunting. These results provide interesting results about the genomic characterization of PRV strains circulating in the swine population and wild boars and reveal a clear differentiation between strains isolated from hunting dogs, which could be referable to the wild boars strains and those originated from domestic swine.

## INTRODUZIONE

Il virus della pseudorabbia (PRV) è un alphaherpesvirus che causa la malattia di Aujeszky, una delle malattie che colpisce frequentemente l'allevamento suinicolo, causando gravi perdite economiche. Unico dal punto di vista antigenico, il virus della PRV ha un ampio spettro d'ospite ma gli unici reservoir dell'infezione sono i suini e i cinghiali.

Il genoma virale è costituito da una doppia catena lineare di Dna di lunghezza pari a 143 kb, suddiviso nelle due uniche regioni U<sub>L</sub> (lunga) e U<sub>S</sub> (corta) intervallate tra loro da due sequenze ripetute (IRS e TRS). Il virione è costituito da numerose proteine di cui 11, tutte glicosilate, sono presenti nell'envelope e sono coinvolte nella patogenesi dell'infezione e nell'induzione della risposta immunitaria. Alcune di queste, come gC e gE, influenzano la virulenza del ceppo, ma non sono importanti per la replicazione virale e hanno consentito lo sviluppo di vaccini deleti che permettono di differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati.

La glicoproteina gC è una importante componente dell'envelope virale che permette al virus di adsorbirsi alla cellula ospite, rappresenta il target verso cui è rivolta l'immunità umorale e cellulo-mediata (Katayama S. *et al.*, 1997) e, inoltre, è una delle regioni più variabili del genoma (Ishkawa *et al.*, 1996).

La glicoproteina gE è una componente dell'envelope che assieme alla glicoproteina gI forma un complesso espresso sulla superficie delle cellule infette ed è quella comunemente deleta nei ceppi vaccinali di PRV utilizzati in Europa. Recentemente, Fonseca *et al* (2010) hanno condotto uno studio di caratterizzazione genetica dei ceppi di PRV isolati in Brasile, amplificando una regione parziale dei geni che codificano per le glicoproteine dell'envelope gC e gE.

In Italia dal 1997 è in vigore il Piano nazionale di controllo della Malattia di Aujeszky (D.M: 1 aprile 1997) che prevede la vaccinazione obbligatoria di tutti i suini allevati con vaccini gE-deleti e l'applicazione di accurate misure di biosicurezza allo scopo di ridurre la prevalenza della malattia a livelli tali da essere compatibile con un successivo piano di eradicazione. Nonostante l'applicazione del piano abbia consentito, soprattutto nei primi 5 anni di attività, di ridurre notevolmente la sieroprevalenza, il virus è oggi ancora ampiamente diffuso negli allevamenti suini italiani con valori di prevalenza elevati (Alborali *et al.*, 2007). Inoltre, l'obbligo della profilassi vaccinale ha determinato una quasi completa eliminazione della sintomatologia clinica, ma non della circolazione del virus "da strada" responsabile di danni economici legati a riduzione delle performance riproduttive e degli incrementi ponderali.

In questo contesto, 36 ceppi di PRV isolati in Italia tra il 2000 ed il 2010 sono stati caratterizzati geneticamente attraverso la sequenza parziale dei geni UL44 e US8 che codificano rispettivamente per le glicoproteine gC e gE allo scopo di approfondire le caratteristiche genomiche dei ceppi PRV circolanti.

## MATERIALI E METODI

### Virus

Lo studio è stato condotto su 36 ceppi di PRV, 29 dei quali di origine suina e 7 di origine canina. I dati riguardanti i campioni conferiti sono riassunti nella tabella 1.

I virus sono stati isolati su monostrati confluenti di colture primarie di rene suino e su monostrati cellulari della linea continua PK15 partendo da matrici biologiche quali omoenati di pool di visceri e tessuto cerebrale. La presenza dell'antigene virale è stata evidenziata tramite ELISA sandwich con l'utilizzo di Ab monoclonali verso le glicoproteine gB e gE. (Brocchi *et al.*, 1990).

### PCR

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit RNeasy (Qiagen, GmbH, Germania) seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice. Il DNA estratto è stato eluito in 30µl di H<sub>2</sub>O nuclease-free e stoccato a -70°C sino ad utilizzo.

L'amplificazione è stata eseguita tramite PCR utilizzando due coppie di primers che amplificano rispettivamente sui geni UL44 e US8, secondo la metodica descritta da Fonseca *et al.* (2010). Di seguito sono riportate le sequenze dei primers e le dimensioni dei frammenti amplificati:

Primer	Sequenza primer (5'-3')	glicoproteina	regione	amplificati (bp)
gC-2U	GTTTCCTGATTACGCCCCACGC	gC	11-32	788
gC-1L	GAAGGGCTCACCGAAGAGGAC		821-841	
gE-nF	CCGCGGGCCGTGTTCTTTGT	gE	592-611	493
gE-nR	CGTGGCCGTTGTGGGTCAT		1066-1084	

#### Sequenziamento ed analisi filogenetica.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi di PRV è stata eseguita attraverso il sequenziamento parziale dei geni gC e gE. Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle dei ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 4.0 utilizzando il metodo del neighbor-joining (Tamura *et al.*, 2007).

### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

L'analisi filogenetica del gene US8 ha suddiviso i ceppi italiani in due gruppi distinti (figura 1). La maggior parte di ceppi provenienti da allevamenti suini (28/29) formano parte del cluster B e presentano una elevata omologia tra loro e con i ceppi di riferimento brasiliano Nova Prata e belga 89V87. All'interno di questo gruppo si posizionano anche la maggior parte di ceppi suini isolati negli ultimi vent'anni in diversi paesi del continente americano ed europeo. Studi di caratterizzazione genomica condotti precedentemente, basati sull'utilizzo degli enzimi di restrizione (RFLP) e successiva comparazione con il sequenziamento (Fonseca *et al.*, 2010), hanno rilevato una correlazione tra il genotipo II evidenziato con la RFLP ed il cluster B. Da sottolineare anche la presenza in questo gruppo di un ceppo isolato da un cane (13814/07) di un allevamento suino venuto a morte con sintomatologia tipica, che presenta il 100% di omologia con la maggior parte dei ceppi suini italiani.

Il secondo gruppo identificato come cluster C, raggruppa tutti i restanti ceppi isolati da cane ed un solo ceppo suino del 2008, isolato da suinetti sottoscrofa di un allevamento di Mantova. Tutti i ceppi di cane appartenenti a questo gruppo sono stati isolati da animali con sintomatologia nervosa specifica utilizzati in attività venatoria e/o alimentati con residui di cinghiale (ad eccezione del numero 101452/10). A questo cluster, identificato recentemente da Fonseca *et al.* (2010), appartengono i ceppi suini di riferimento di origine belga NS374 ed 75V19 isolati negli anni 70 ed il ceppo brasiliano IB341/86 isolato nel 1986.

L'analisi filogenetica del gene UL44 ha evidenziato la presenza di una maggiore eterogeneità tra i ceppi PRV (figura 2). Come descritto per il gene US8, la maggior parte dei ceppi isolati da suino (26) ed il ceppo di cane 13814/07 si posizionano in un unico gruppo (cluster B) e presentano una elevata percentuale di omologia tra loro con il ceppo di riferimento Nova Prata (da 99,7% a 100%). Un altro gruppo omogeneo è rappresentato dai ceppi isolati da cani

da caccia e da un ceppo italiano del 1993 isolato da cinghiale (Capua *et al.*, 1997) a conferma di una probabile trasmissione dei ceppi tipici del cinghiale ai cani utilizzati nelle attività venatorie. Da sottolineare è inoltre la presenza di due ceppi suini isolati nel 2008 (97897/08 e 32501/08) geneticamente distinti dagli altri ed altamente correlati con il ceppo di cane 101452/10 ed il ceppo brasiliano 346/86.

Tra i ceppi studiati un solo ceppo suino (4742/00) isolato in un allevamento della provincia di Brescia è altamente correlato con il ceppo di riferimento nord irlandese NIA3 all'interno del cluster A. Sulla base di un precedente studio, questo cluster corrisponde al genotipo I evidenziato tramite RFLP, al quale sarebbe peraltro attribuiti i ceppi isolati negli anni 70 ed 80 (Capua *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 2010). Altri studi hanno riportato una quasi assente circolazione di ceppi appartenenti a questo genotipo dal 1990 in Europa ed in America (Capua *et al.*, 1997; Piatti *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2006) così come una minore virulenza di questi rispetto a quelli del genotipo II (Glorieux *et al.*, 2009). La maggiore virulenza dei ceppi del genotipo II è stata considerata una delle cause della drastica riduzione della circolazione del genotipo I nella popolazione suina. Questo invece non è avvenuto nella popolazione di cinghiale dove circolano soprattutto i ceppi genotipicamente correlati ai ceppi PRV degli anni 70-80. La nostra indagine ha confermato che i ceppi prevalentemente diffusi nella popolazione suina appartengono al genotipo II, ma ha anche rilevato la presenza di stipiti virali altamente correlati con i ceppi degli anni 70.

I risultati ottenuti dal presente studio hanno permesso di distribuire i ceppi di PRV italiani in clusters virali evidenziando una netta distinzione tra i ceppi isolati da cani adibiti ad attività venatoria, e quindi riconducibili al cinghiale, da quelli isolati da suini domestici. Ventisei ceppi isolati da suino appartengono per il gene gC e il gE al cluster B che raggruppa la maggior parte di ceppi PRV recentemente isolati da suini in Europa ed America. Un solo ceppo suino presenta una elevata correlazione con i ceppi PRV isolati negli anni 70-80, attualmente quasi scomparsi nella popolazione suina ma prevalenti nei cinghiali. I due ceppi suini restanti sono correlati ai ceppi PRV storici per quanto riguarda il gene gC mentre per il gene gE sono simili ai ceppi PRV recenti.

Dai 7 ceppi isolati da cane, 5 ceppi provengono da cani da caccia e presentano una elevata percentuale di omologia con i ceppi isolati da cinghiale. Un ceppo isolato da un cane di un allevamento suino è risultato altamente correlato con i ceppi suini recenti. L'ultimo ceppo 101452/10, isolato nel 2010 in provincia di Brescia, possiede il gene gC simile ai due ceppi suini sopra riportati. Non è stato possibile reperire molti dati anamnestici relativi a questo ceppo, tuttavia è stato isolato da un cane di piccola taglia venuto a morte a seguito di sintomatologia nervosa a fine Aprile 2010 dopo chiusura della stagione venatoria per il cinghiale.

Il 97% dei ceppi suini sono stati isolati in allevamenti localizzati nel Nord Italia, tuttavia possiamo considerare la situazione descritta rappresentativa della popolazione suina italiana in quanto in quest'area si concentra il 75% della suinicoltura.

Per approfondire maggiormente le informazioni ottenute da questo studio e allo scopo di meglio caratterizzare soprattutto quei ceppi che vengono classificati in cluster diversi, si ritiene necessario il sequenziamento di una porzione più ampia di genoma virale per confermare i risultati ottenuti.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Alborali L., Guadagnini G., Accini A., Zanoni ., Salogni C., Cordioli P. (2007) "Sieroprevalenza della malattia di Aujeszky in suini pesanti macellati in Pianura Padana". XXXIII Meeting annuale SIPAS, Modena 29-30 marzo, 283-287
- Brocchi E., Berlincani 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 ceppi GI-deleti” . Volume XLIV Atti della Società Italiana e delle Scienze Veterinarie., Stresa 27-29 settembre, 913-918

- Capua I., Casaccia C., Calzetta G., Caporale V. (1997) “Characterisation of Aujeszky’s disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995”. *Vet Microbiol.* 57, 143-149

- Fonseca Jr. A.A., Camargos F.M., Macedo de Oliveira A., Ciacci-Zanella J., Patricio M.A.C., Braga A.C., Cunha E.S., D’Ambros R., Heinemann M.B., Leite R. C., Pimenta dos reis J.K. (2010) “Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates”. *Vet Microbiol* 141, 238-245

- Glorieux S., Favoreel H.M., Meesen G., de Vos W., Van den Broeck W., Nauwynck H.J. (2009) “Different replication characteristic of historical pseudorabies virus strains in porcine respiratory nasal mucosa explants” *Vet. Microbiol.* 136(3-4),341-346

- Ishikawa K., Tsutsui M., Taguchi K., Saitoh A., Muramatsu M. (1996) “Sequence variation of the gC gene among pseudorabies virus strains”. *Vet. Microbiol.* 49, 267–272

- Katayama S., Okada N., Yoshiki K-i, Okab T., Shimizu Y. (1997) “Protective effect of glycoprotein gC-rich antigen pseudorabies virus”. *J Vet Med Sci* 59, 657-663

- Muller T., Klupp B.G., Freuling C., Hoffmann B., Mojcicz M., Capua I., Palfi V., Toma B., Lutz W., Ruiz-fon F., Gortarzar C., Hlinak A., Schaarschmidt U., Zimmer K., Coraths F.J., Hahn E.C., Mettenleiter T.C. (2010) “Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe”. *Epidemiol. Infect.* 138,1590-1600

- Piatti R.M., Ikuno A.A., Cunha E. S., D’Ambros R., Gregori F., Soares R.M., Cortez A., Richtzenhain L.J. (2001) “Characterization of Aujeszky’s disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis”. *Braz. J. Microbiol.* 32, 144-146

- Schaefer R., Ciacci-Zanella J., Mores N., Kleitton A., Dambros R.M.F., Schiochet M.F., Coldebella M. (2006) “Characterization of Aujeszky’s disease virus isolates from South Brazil in the last twenty years by restriction enzyme analysis”. *Braz. J. Microbiol.* 37, 390-394

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) “MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0”. *Mol. Biol. Evolut.* 24, 1596–1599

## **RINGRAZIAMENTI**

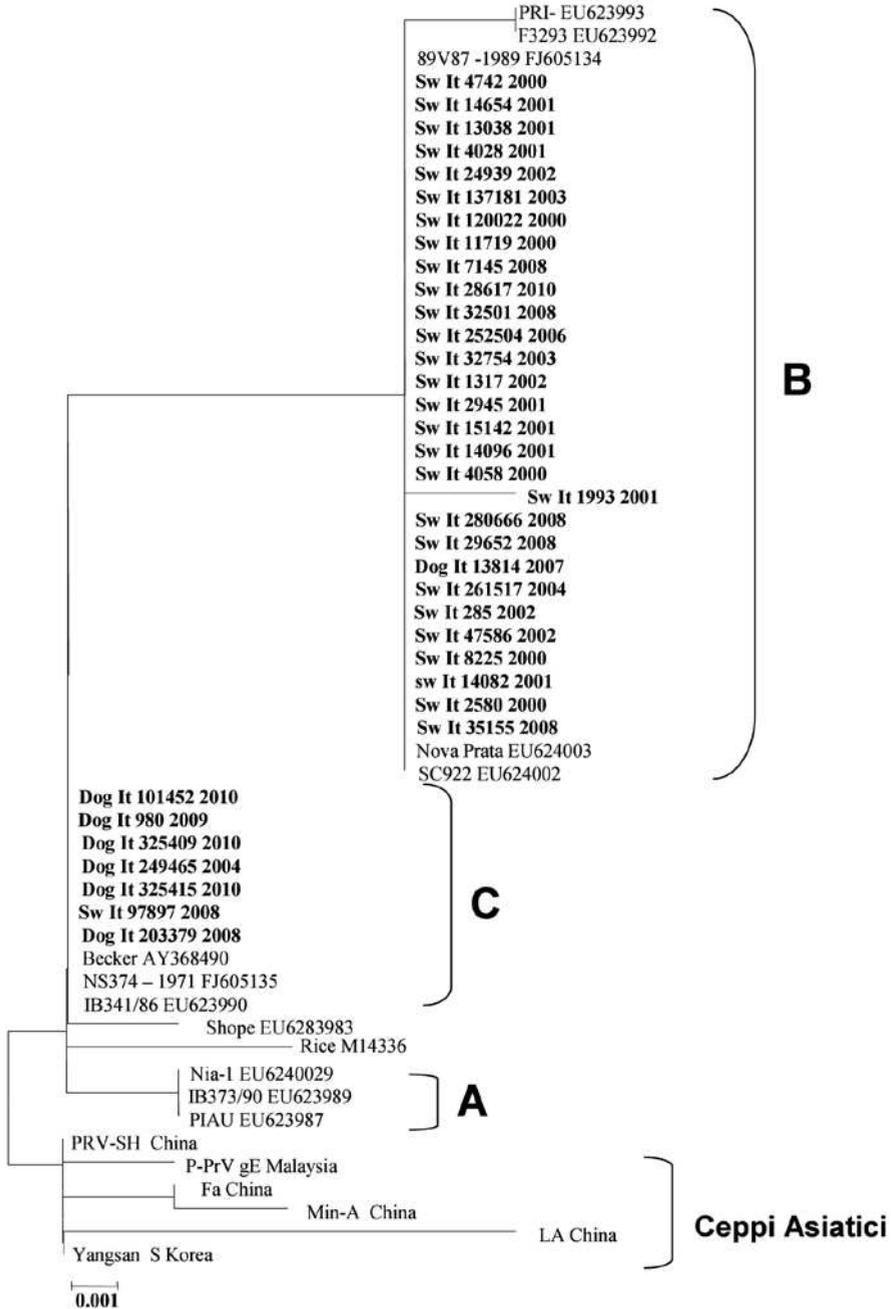
Questo lavoro è stato realizzato all’interno del Progetto di Ricerca PRC2007009 “Strategie diagnostiche di controllo della malattia di Aujeszky con particolare riferimento a diversi fattori che influenzano negativamente l’esito del Piano di eradicazione” finanziato dal Ministero della Salute.

Si ringraziano per l’eccellente supporto tecnico le Sig.re Annamaria Tirelli e Sonia Manenti.

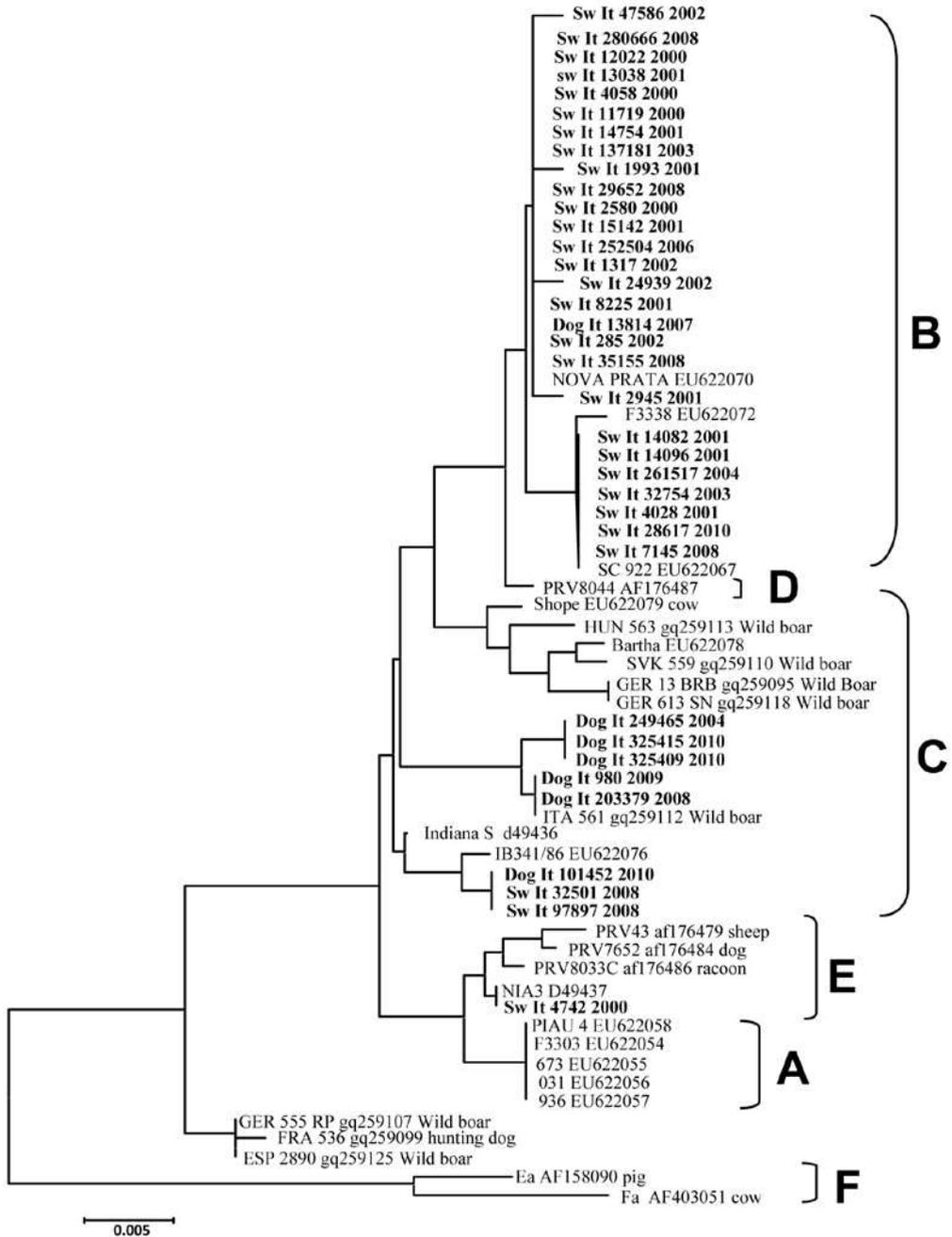
**Tab.1** *Ceppi di PRV oggetto dello studio suddivisi per anno.***Tab.1** *PRV isolated strains used in this study.*

	Anno	Darwin	Provincia	Specie	Materiale
1	2010	28617	RE	Suino	cervello
2		101452	BS	Cane	cervello
3		325415	BO	Cane	cervello
4		325409	BO	Cane	cervello
5	2009	980	RE	Cane	cervello
6	2008	7145	BS	Suino	cervello
7		29652	MN	Suino	visceri
8		32501	BS	Suino	visceri
9		35155	BS	Suino	visceri
10		97897	MN	Suino	visceri
11		203379	RE	Cane	visceri
12		280666	BS	Suino	visceri
13	2007	13814	CR	Cane	cervello
14	2006	252504	BS	Suino	visceri
15	2004	249465	BO	Cane	visceri
16		261517	BS	Suino	polmoni
17	2003	32754	CR	Suino	feto
18		137181	BS	Suino	feto
19	2002	285	MO	Suino	polmoni
20		1317	LO	Suino	polmoni
21		24939	BG	Suino	feto
22		47586	BS	Suino	polmoni
23	2001	1993	BG	Suino	polmoni
24		2945	BS	Suino	polmoni
25		4028	MI	Suino	polmoni
26		8225	BN	Suino	cuore
27		15142	LO	Suino	feto
28		13038	BS	Suino	feto
29		14082	CN	Suino	polmoni
30		14096	BS	Suino	polmoni
31		14754	BG	Suino	visceri
32	2000	2580	MN	Suino	polmoni
33		4058	BS	Suino	visceri
34		4742	BS	Suino	visceri
35		11719	FO	Suino	polmoni
36		12022	MO	Suino	polmoni

**Figura 1** - Albero filogenetico costruito sulle sequenze del gene gE utilizzando il metodo del neighbor-joining. In grassetto sono evidenziati i ceppi di Prv sequenziati in questo studio. **Figure 1**- Phylogenetic tree based on the sequences of the gE gene using the neighbor-joining method. The PRV strains sequenced in this study are evidenced in bold type.



**Figura 2.** Albero filogenetico costruito sulle sequenze del gene gC utilizzando il metodo del neighbor-joining. In grassetto sono evidenziati i ceppi di Prv sequenziati in questo studio.  
**Figure 2.** Phylogenetic tree based on the sequences of the gC gene using the neighbor-joining method. The PRV strains sequenced in this study are evidenced in bold type.



# MODULAZIONE DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE E IMMUNITARIE IN PBMC DI SUINI VACCINATI E NON VACCINATI ESPOSTI A INFEZIONE NATURALE DA CIRCOVIRUS TIPO 2 DEL SUINO (PCV2)

## *MODULATION OF PRO-INFLAMMATORY AND IMMUNE CYTOKINES IN PBMC OF VACCINATED AND UNVACCINATED PIGS EXPOSED TO PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) NATURAL INFECTION*

FERRARI L., MORGANTI M., BORGHETTI P., DE ANGELIS E., MARTELLI P.

*Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma*

**Parole chiave:** suino, circovirus tipo 2 (PCV2), vaccinazione, infezione, citochine pro-infiammatorie e immunitarie, PBMC.

**Key words:** pig, porcine circovirus type 2 (PCV2), vaccination, infection, pro-inflammatory and immune cytokines, PBMC.

**Riassunto.** Nel presente studio si è valutata la modulazione di citochine pro-infiammatorie (IL-8, TNF- $\alpha$ ) e immunitarie (IFN- $\gamma$ , IL-10) in PBMC di suini vaccinati contro PCV2 con dose singola di un vaccino basato su proteina virale Cap e in suini non vaccinati esposti a infezione naturale. La risposta citochinica negli animali non vaccinati-infetti è stata valutata in relazione al manifestarsi di evidente sintomatologia clinica riconducibile alla sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS). I suinetti di un allevamento a ciclo chiuso con anamnesi positiva per PMWS in soggetti di età superiore a 15 settimane sono stati svezzati a  $21 \pm 3$  giorni di età; gli animali del gruppo vaccinato hanno ricevuto una dose di vaccino Porcilis PCV<sup>®</sup> in adiuvante per via intramuscolare (2 ml) mentre lo stesso volume di solo adiuvante è stato inoculato negli animali del gruppo controllo. Sono stati prelevati campioni di sangue prima dell'insorgenza della viremia per PCV2 (16 settimane di età) e successivamente all'avvenuta infezione e comparsa delle manifestazioni cliniche di PMWS (19 e 22 settimane di età). La modulazione citochinica, come livelli di espressione genica mediante real-time PCR, è stata valutata in suini vaccinati (PCV2-vac), suini non vaccinati spontaneamente infettati in assenza di PMWS (Ctrl) e suini non vaccinati infettati che hanno sviluppato PMWS (Ctrl-PMWS+). I livelli di IL-8 sono apparsi più elevati nei soggetti controllo-PMWS+ in fase precoce e più ridotti in fase più tardiva, segnale di uno stato infiammatorio precoce più intenso ed una risposta innata successiva meno efficiente. I livelli di TNF- $\alpha$ , così come di IFN- $\gamma$ , legati ad una risposta innata e adattativa, si sono mostrati più elevati nel gruppo vaccinato ad entrambi i tempi post-infezione. Nel gruppo controllo-PMWS+, bassi livelli di IFN- $\gamma$  a 19 settimane di età sono risultati associati a livelli elevati di IL-10, come condizione predisponente l'insorgenza della PMWS. I risultati sostengono la differente modulazione del profilo citochinico in animali vaccinati ed animali non vaccinati in relazione alla infezione e alla comparsa della patologia associata. Gli animali vaccinati affrontano l'infezione mostrando maggiore reattività cellulare legata all'IFN- $\gamma$  e l'assenza di effetti regolatori negativi legati all'espressione di IL-10, così come l'assenza di stati infiammatori intensi a seguito della infezione.

**Summary.** In the present study the modulation of pro-inflammatory (IL-8, TNF- $\alpha$ ) and

immune (IFN- $\gamma$ , IL-10) cytokines was evaluated in PBMC of pigs vaccinated against PCV2 with a single dose-vaccine based on the viral Cap protein and in unvaccinated pigs exposed to natural infection. The cytokine response in unvaccinated-infected animals was evaluated with regards to evident clinical signs related to post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In a farrow-to-finish herd with a positive history for PMWS in animals aged older than 15 weeks, at weaning ( $21 \pm 3$  days of age) a group of animals (vaccinated group) were inoculated with one dose of Porcilis PCV<sup>®</sup> vaccine + adjuvant by the intramuscular route (2 ml) whereas the same volume of adjuvant only was administered to the control animals. Blood samples were collected before the onset of PCV2 viremia (16 weeks of age), after infection and after the onset of the clinical signs referred to PMWS (19 and 22 weeks of age, respectively). Cytokine modulation was assessed in vaccinated (PCV2-vac), unvaccinated spontaneously infected/PMWS-free (Ctrl) and unvaccinated infected/PMWS-affected (Ctrl-PMWS+) pigs as gene expression levels by real-time PCR. IL-8 levels were higher in Ctrl-PMWS+ pigs early after infection and lower at the later stage, testifying a stronger early inflammatory status and subsequent less efficient innate responsiveness. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels, evidence of innate and adaptive responses, were higher in the PCV2-vac group at both time points. In the Ctrl-PMWS+ group, a lower IFN- $\gamma$  level at 19 weeks of age was associated with high levels of IL-10, as a condition correlated with the onset of the disease. Overall, the results show a different cytokine modulation in vaccinated and unvaccinated-infected pigs also developing PMWS. Vaccinated pigs cope with infection showing stronger cellular reactivity related to IFN- $\gamma$  and absence of a negative regulatory effects due to increase of IL-10 expression, as well as absence of intense inflammatory status following infection.

## INTRODUZIONE

Circovirus tipo 2 (PCV2) è l'agente eziologico della sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento del maiale (PMWS), patologia multifattoriale ampiamente diffusa negli allevamenti suinicoli che rappresenta una delle manifestazioni cliniche delle cosiddette patologie associate a PCV2 (Porcine Circovirus Associated Diseases, PCVD). Oltre a procedure gestionali, la principale strategia per la prevenzione ed il controllo delle patologie associate all'infezione da PCV2 è la vaccinazione. Tra i vaccini sviluppati, è stato dimostrato sia a livello sperimentale sia in campo che i vaccini basati sulla proteina virale capsidica (Cap) sono efficaci in quanto tale proteina costituisce uno dei determinanti antigenici maggiormente immunogenici (Blanchard et al., 2003; Fenaux et al., 2004; Fort et al., 2009a, 2009b; Pérez-Martin, 2010). L'efficacia vaccinale si associa a sierconversione verso PCV2 (comparsa di anticorpi neutralizzanti virus-specifici) e alla riduzione della replicazione virale; sempre maggiori prove sia in condizioni di infezione sperimentale che naturale supportano il coinvolgimento della risposta cellulare nel controllo dell'infezione e dell'evoluzione delle patologie associate (Fenaux et al., 2004; Kixmoller et al., 2008; Fort et al., 2009a, 2009b; Steiner et al., 2009; Pérez-Martin et al., 2010; Martelli et al., 2011).

L'attivazione del sistema immunitario e di risposte specifiche verso il virus o verso componenti virali è tutt'oggi oggetto di studio soprattutto in relazione alla determinazione di correlazioni tra determinanti genetici/antigenici e protezione clinica; informazioni riguardanti la componente cellulare hanno mostrato come la risposta proliferativa PCV2-specifica a seguito di stimolazione *in vitro* è attribuibile sia a linfociti T CD4+ che CD8+ specifici verso la proteina Cap (Wang et al., 2007, Steiner et al., 2009). Anche la produzione di citochine pro-infiammatorie e immunitarie durante l'infezione da PCV2 è di recente studio in soggetti infetti asintomatici e in soggetti affetti da PMWS, in particolar modo a seguito di stimolazione *in vitro* con antigeni virali o sostanze mitogene. Tali indagini

sono state effettuate in tessuti linfoidi primari e secondari (Darwich et al., 2003b; Zhang et al., 2010), polmone (Chae e Choi, 2010) e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) (Kekarainen et al., 2008a, 2008b, 2010; Shi et al., 2010) ma i risultati sono apparsi spesso non univoci, probabilmente per la variabilità delle condizioni in cui sono state determinate.

Nonostante ciò, una caratteristica ritrovata in vari modelli di infezione e di PMWS (soprattutto nei casi di evidente immunosoppressione) è rappresentata dall'incremento dei livelli di espressione o secrezione di IL-10 associati all'insorgenza e sviluppo della patologia, così come di riduzione di IFN- $\gamma$ , citochina fondamentale nella risposta antivirale (Darwich et al., 2003a; Stevenson et al., 2006; Crisci et al., 2010).

Il presente studio ha come scopo la valutazione della reattività cellulare valutata come livelli di espressione genica di alcune delle principali citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) e immunitarie (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4) in PBMC di suini vaccinati con singola dose di vaccino basato su proteina Cap di PCV2 in adiuvante e animali non vaccinati successivamente esposti ad infezione naturale da PCV2 anche in relazione alla comparsa di sintomatologia specifica della PCVD (malattia associata all'infezione da Circovirus).

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Lo studio di campo è stato condotto in doppio-cieco e in modo random in suinetti di un allevamento a ciclo chiuso con anamnesi positiva per manifestazioni cliniche e relativa mortalità da PMWS in soggetti di età superiore a 15 settimane.

Un totale di 411 suinetti (maschi e femmine) è stato considerato per lo studio. All'inizio della prova (giorno dello svezzamento: 21 $\pm$ 3 giorni di età), 205 suinetti (gruppo PCV2-vac) hanno ricevuto una singola dose di vaccino Porcilis PCV<sup>®</sup> per via intramuscolare (2 ml). Uno stesso volume di solo adiuvante è stato somministrato a 206 suinetti di controllo.

La risposta citochinica è stata valutata in tre gruppi di animali: 1) animali (N = 5) non vaccinati e spontaneamente infettati che hanno manifestato evidente sintomatologia riconducibile a PMWS (Controlli PMWS+: Ctrl-PMWS+) 2) animali non vaccinati (N = 15), spontaneamente infettati da PCV2 che non hanno sviluppato la PMWS (Controlli: Ctrl); 3) animali vaccinati (N = 10) con singola dose di vaccino per via intramuscolare (PCV2-vac) che non si sono infettati e che non hanno sviluppato la malattia.

Lo stato di malattia (PMWS+) è stato determinato attraverso l'attribuzione di uno score clinico basato sulla valutazione del grado di deperimento e l'ingrossamento dei linfonodi inguinali, in associazione a positività in qPCR per PCV2 nel siero con quantità di copie di genoma virale/ml superiore a 10<sup>7</sup> (Martelli et al., 2011).

La presenza di co-infezioni e la quantificazione di titoli anticorpali verso PRRSV, *M. hyopneumoniae*, ADV, A. pleuropneumoniae e virus dell'influenza suina (SIV) sono stati determinati mediante kit specifici in commercio come ampiamente descritto da Martelli et al. (2011).

Sono stati effettuati prelievi di sangue a 16 settimane di età (fase immediatamente precedente l'insorgenza della viremia da PCV2), a 19 e 22 settimane rispettivamente dopo la comparsa dell'infezione e a malattia conclamata nei soggetti appartenenti al gruppo (PMWS+).

### **Isolamento di PBMC di suino ed estrazione di RNA totale.**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state separate ed isolate mediante gradiente di densità in soluzione Histopaque-1077<sup>®</sup> e la successiva estrazione di RNA totale cellulare è stata effettuata mediante soluzione TRI-reagent<sup>®</sup> (Ambion) secondo le istruzioni riportate dal produttore. Il grado di purezza e la concentrazione sono state determinate mediante spettrofotometria UV (260/280 nm). L'RNA totale estratto (1  $\mu$ g) è

stato retro-trascritto in DNA complementare (cDNA) con kit High-capacity cDNA Reverse Transcription® kit (Applied Biosystems).

### Quantificazione dell'espressione genica in PBMC mediante real-time PCR.

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come DNA stampo per la real-time PCR. La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore StepOne™ (Applied Biosystems, StepOne software v. 2.1). Il cDNA (20 ng, 1 ng/μl) è stato amplificato in duplicato con Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG® (Invitrogen) e primer specifici per le citochine di suino a concentrazioni ottimizzate secondo dati in letteratura (von der Hardt et al., 2002; Royae et al., 2004; Meissonnier et al., 2008) e utilizzando il software Primer Express (Tab. 1). Il gene housekeeping GAPDH è stato scelto come controllo endogeno secondo Fisher et al. (2006) e Ferrari et al. (2010). Le reazioni di PCR hanno previsto uno step iniziale a 95°C per 20" e 40 cicli costituiti da denaturazione a 90°C per 3" e annealing/estensione a 60°C per 30" (protocollo "PCR Fast" - Applied Biosystems). Il segnale dovuto all'incorporazione di SYBR® Green è stato acquisito alla fine di ciascuno step di estensione. Un controllo negativo (assenza di cDNA) è stato aggiunto in ciascun set di reazioni. Un'analisi mediante curva di denaturazione (gradiente da 60°C a 95°C) è stata effettuata per valutare l'amplificazione specifica del gene indagato e l'assenza di prodotti aspecifici (es. dimeri di primer) al termine di ogni reazione. I risultati sono stati analizzati mediante metodo del delta-delta-Ct (Shi et al., 2010), e i livelli di espressione di ciascuna citochina normalizzati con i livelli di GAPDH ed espressi come quantità relative sono stati calcolati rispetto al livello di espressione in animali vaccinati per PCV2 non infetti in una fase molto precoce del periodo post-esposizione (accertata assenza di infezione da PCV2).

Gene	Sequenza primer (forward - reverse)
<b>IL-8</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'
	<i>rev</i> 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'
<b>TNF-α</b> (Meissonnier et al., 2008)	<i>for</i> 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'
	<i>rev</i> 5'-GGCGACGGGCTTATCTGA-3'
<b>IFN-γ</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-TGGTAGCTCTGGGAACTGAATG-3'
	<i>rev</i> 5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'
<b>IL-10</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'
	<i>rev</i> 5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAGAAA-3'
<b>GAPDH</b> (Primer Express)	<i>for</i> 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'
	<i>rev</i> 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'

**Tab. 1:** Sequenze primer delle citochine pro-infiammatorie (IL-8, TNF-α) e immunitarie (IFN-γ, IL-10) indagate. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno.

### **Analisi statistica.**

L'analisi statistica volta ad evidenziare differenze significative tra i gruppi di animali esposti ad infezione da PCV2 e in relazione al tempo sperimentale indagato è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) e test di Dunnet. Il grado di significatività è stato definito per  $p < 0.05$ .

### **RISULTATI**

Lo studio ha previsto la valutazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie e immunitarie in PBMC di suini vaccinati verso PCV2 e di suini non vaccinati che hanno manifestato o meno la patologia associata all'infezione.

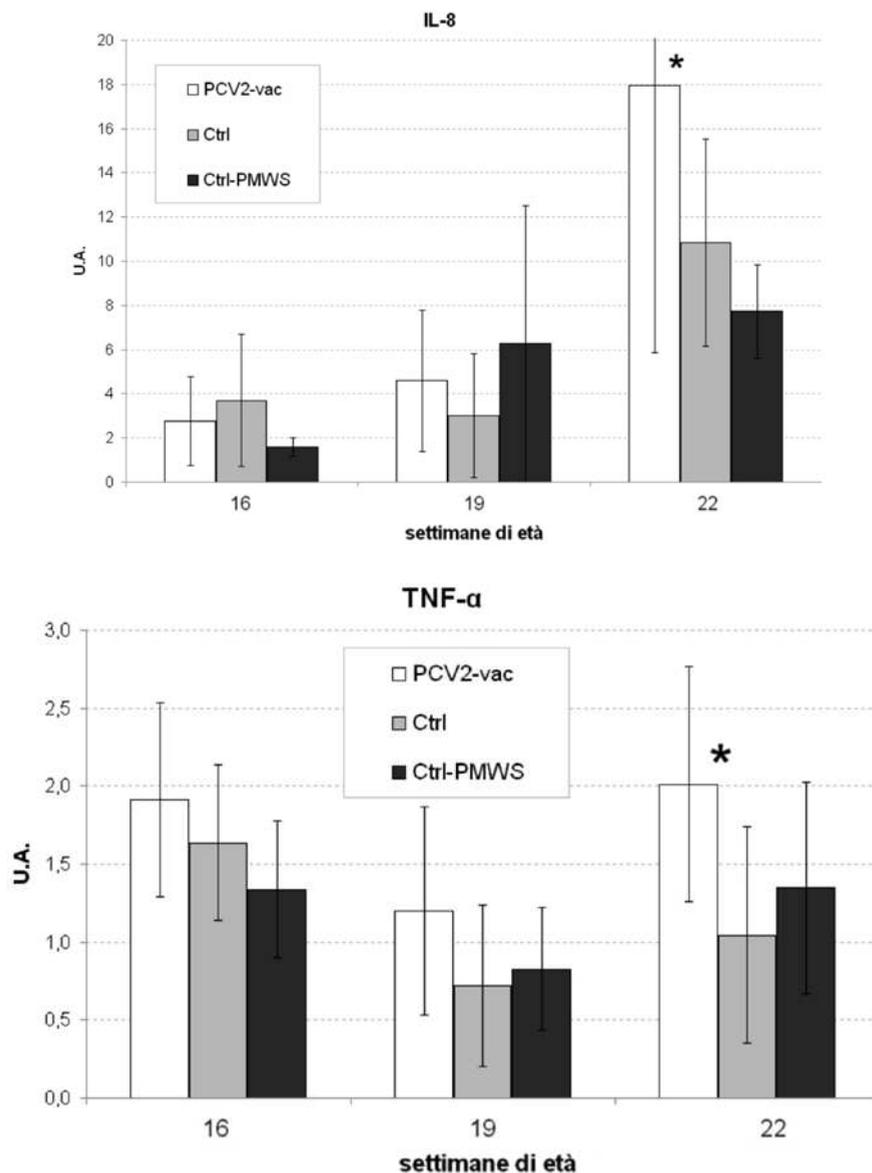
Nel periodo in cui è avvenuta l'infezione naturale si sono potute evidenziare modificazioni significative dell'espressione genica delle citochine indagate.

I livelli di espressione genica di IL-8 hanno evidenziato una tendenza ad incrementarsi nel tempo, con valori più elevati negli animali vaccinati a 22 settimane di età rispetto ai due gruppi controllo ( $p < 0.05$ ; Fig. 1).

L'espressione di TNF- $\alpha$  è risultata più elevata negli animali vaccinati a 19 settimane e soprattutto a 22 settimane di età ( $p < 0.05$ ; Fig. 1).

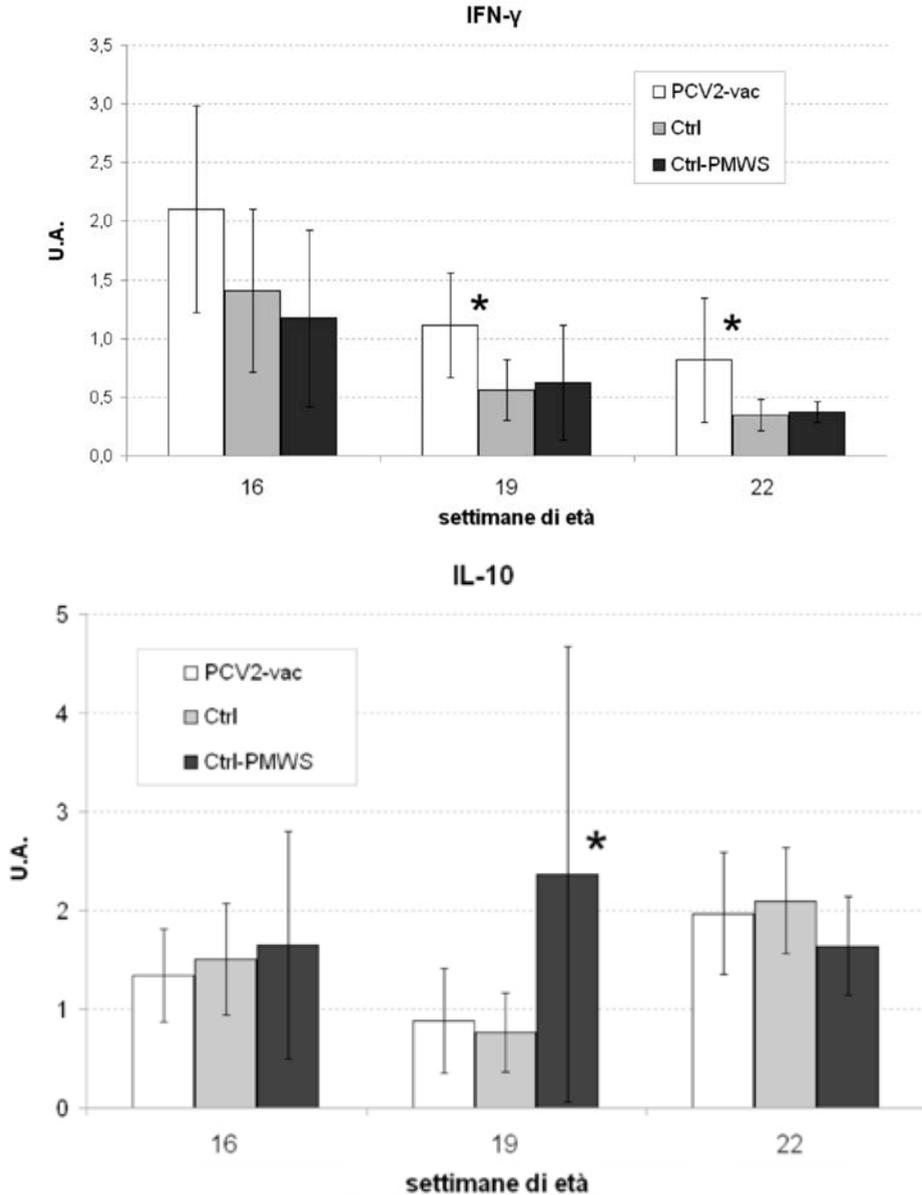
I livelli di IFN- $\gamma$  sono risultati statisticamente più elevati negli animali vaccinati-esposti (PCV2-vac) a 19 e 22 settimane di età ( $p < 0.05$ ) in confronto con i livelli di IFN- $\gamma$  sia negli animali controllo che hanno sviluppato la PMWS (Ctrl-PMWS+) sia negli animali che non hanno manifestato la patologia (Ctrl) (Fig. 2).

Il livello di espressione di IL-10 è risultato significativamente più elevato nel gruppo Ctrl-PMWS+ a 16 settimane PV ( $p < 0.05$ ) in confronto con gli animali del gruppo PCV2-vac e Ctrl (Fig. 2).



**Fig. 1:** *Espressione genica delle citochine pro-infiammatorie IL-8 e TNF- $\alpha$  in PBMC di suini vaccinati (PCV2-vac) e non vaccinati in assenza (Ctrl) o presenza (Ctrl-PMWS) di PMWS esposti a infezione naturale da PCV2. I dati sono mostrati come valori medi  $\pm$  deviazione standard. U.A.: unità arbitrarie. (\*):  $p < 0.05$*

**Fig. 1:** *Gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF- $\alpha$  in PBMC of vaccinated (PCV2-vac) and unvaccinated PMWS-free (Ctrl) or PMWS-affected (Ctrl-PMWS) pigs exposed to PCV2 natural infection. Data are shown as mean values  $\pm$  standard deviation. U.A.: arbitrary units. (\*):  $p < 0.05$*



**Fig. 2:** Espressione genica delle citochine immunitarie IFN- $\gamma$  e IL-10 in PBMC di suini vaccinati (PCV2-vac) e non vaccinati in assenza (Ctrl) o presenza (Ctrl-PMWS) di PMWS esposti a infezione naturale da PCV2. I dati sono mostrati come valori medi  $\pm$  deviazione standard. U.A.: unità arbitrarie. (\*):  $p < 0.05$

**Fig. 2:** Gene expression of the immune cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 in PBMC of vaccinated (PCV2-vac) and unvaccinated PMWS-free (Ctrl) or PMWS-affected (Ctrl-PMWS) pigs exposed to PCV2 natural infection. Data are shown as mean values  $\pm$  standard deviation. U.A.: arbitrary units. (\*):  $p < 0.05$

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente studio sono stati analizzati i cambiamenti dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie e immunitarie in suini vaccinati per PCV2 mediante vaccino basato su proteina virale Cap ed in animali non vaccinati, successivamente esposti ad infezione naturale in relazione all'insorgenza di manifestazioni cliniche riconducibili a PMWS. Informazioni sull'attivazione di mediatori immunitari quali le citochine e sulle sottopopolazioni cellulari coinvolte nella loro produzione in scenari di infezione singola e/o co-infezioni sono alla base del miglioramento delle strategie e dei protocolli vaccinali finalizzati al controllo delle problematiche associate.

Gli animali considerati nello studio sono stati monitorati nel periodo post-esposizione e successiva infezione naturale con prelievi di sangue e relative indagini molecolari effettuati a 16, 19, 22 settimane di età.

La modulazione dell'espressione di una citochina pro-infiammatoria come l'IL-8 negli animali del gruppo non vaccinato che hanno manifestato PMWS può essere riconducibile ad uno stato infiammatorio precoce più pronunciato legato all'insorgenza dell'infezione mentre, successivamente, la riduzione di tale citochina può testimoniare una risposta difensiva innata meno efficiente. Questi dati sono in accordo con quanto descritto in letteratura a seguito di ristimolazione *in vitro* di PBMC (Darwich et al., 2003a). Viceversa, si può considerare che gli animali vaccinati, in cui la reattività immunitaria verso PCV2 si è mantenuta efficiente (presenza di anticorpi PCV2-specifici e di cellule secernenti IFN- $\gamma$ ; dati non mostrati, Martelli et al., 2011), in seguito all'infezione non necessitano di attivare meccanismi infiammatori precoci mentre nelle fasi di infezione più avanzata mostrano capacità pro-infiammatoria più elevata rispetto agli animali non vaccinati. In questi ultimi tale espressione potrebbe essere modulata in senso negativo dall'infezione. In altre parole, negli animali vaccinati, ciò potrebbe testimoniare una maggior reattività della risposta innata con replicazione virale assente o minima. I valori ottenuti in fase avanzata di infezione (22 settimane di età) trovano corrispondenza nel riscontro di livelli ridotti di IL-8 nei tessuti linfoidi con il progredire della patologia e l'aumento delle lesioni stesse (Darwich et al., 2003b).

I livelli di TNF- $\alpha$  si sono mantenuti inferiori nei due gruppi non vaccinati. Tale comportamento, che conferma una ridotta efficienza della risposta immunitaria infiammatoria/innata, potrebbe trovare una spiegazione patogenetica soprattutto nel ruolo esercitato dalla co-infezione sostenuta da PRRSV, virus in grado di inibire/ritardare la risposta legata a tale citochina (Borghetti et al., 2010), più che dall'infezione singola da PCV2 (Shi et al., 2010).

Le citochine immunitarie antagoniste, IFN- $\gamma$  e IL-10, hanno mostrato livelli opposti nella fase precoce della infezione da PCV2; in particolare, gli animali del gruppo Ctrl-PMWS+ hanno mostrato livelli di IL-10 significativamente maggiori rispetto agli altri due gruppi e, pur con ampia variabilità individuale, si deve segnalare la presenza di valori molto elevati in alcuni animali. Al contrario, ad entrambi i tempi post-esposizione 19 e 22 settimane di età, i livelli di IFN- $\gamma$  si sono mantenuti su livelli superiori negli animali vaccinati-esposti.

Tali risultati confermano come anche nelle condizioni di infezione naturale da PCV2 ed in presenza di co-infezioni, la modulazione citochinica coinvolga alterati livelli di IL-10 come possibile fattore predisponente l'insorgenza della PMWS (Stevenson et al., 2006). Rispetto ad altre citochine infatti, l'aumento dell'espressione e produzione di IL-10 sia a livello tissutale che nelle PBMC è una evidenza che si riscontra sia in studi sperimentali di infezione singola da PCV2 che in casi di co-infezione da PCV2 e PRRSV (Shi et al., 2010; Kekarainen et al., 2008b).

L'aumento di IL-10 negli animali non vaccinati potrebbe anche essere correlabile ai livelli più ridotti delle citochine pro-infiammatorie indagate oltre che dei livelli di IFN- $\gamma$  come quadro di regolazione immunosoppressiva negli animali con PMWS (Shi et al., 2010). L'IL-10 durante l'infezione da PCV2 e l'insorgenza delle patologie associate è prodotta principalmente da cellule della linea monocitaria-macrofagica e dendritica ma anche cloni di cellule T, resi anergici dalla prolungata stimolazione antigenica, potrebbero essere responsabili della produzione di tale

citochina; infatti PCV2 è in grado di indurre rilascio di IL-10 dalle PBMC e a livello tissutale (Darwich et al., 2003a; Kekarainen et al., 2008b; Crisci et al., 2010).

La valutazione della risposta mediata da IFN- $\gamma$  riveste un ruolo chiave in quanto tale citochina è responsabile della regolazione ed amplificazione della risposta antivirale. I livelli più elevati di IFN- $\gamma$  negli animali vaccinati sostengono la maggior reattività in animali in cui l'infezione è contrastata in modo rapido ed efficace tanto da non determinare riscontro di viremia come osservato nella presente ricerca (dati non mostrati, Martelli et al., 2011).

I quadri di associazione tra titoli virali nel siero e incremento dell'espressione di IFN- $\gamma$  nonché della frequenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$ , sottolineano l'importanza dell'attivazione cellulare a fianco della risposta umorale anticorpale nella limitazione della replicazione di PCV2 (Meerts et al., 2005; Fort et al., 2009a, 2009b; Martelli et al., 2011). Livelli di espressione ridotta di IFN- $\gamma$  sono stati riscontrati sia in PBMC (Darwich et al., 2003a; Sipos et al., 2004; Shi et al., 2010) che nei tessuti linfoidi (Darwich et al., 2003b) di animali affetti da PMWS. Anche in questo caso l'effetto osservato può essere la risultante della sinergia data dalle co-infezioni (Shi et al., 2010).

Il profilo dell'espressione genica di IFN- $\gamma$  nelle PBMC è apparso di senso opposto rispetto a quanto osservato per i livelli di cellule secernenti tale citochina quantificati mediante tecnica ELISpot (Martelli et al., 2011): in entrambi i gruppi di animali controllo, la minor espressione di IFN- $\gamma$  è associata a livelli fortemente più elevati di cellule secernenti IFN- $\gamma$ . Il comportamento opposto in relazione alle due metodiche utilizzate può essere messo in relazione al fatto che le cellule secernenti IFN- $\gamma$  sono state quantificate a seguito di ri-stimolazione con ceppo virulento di PCV2 mentre l'espressione genica può essere la risultante della presenza di co-infezioni. Inoltre, animali vaccinati possono necessitare di un numero minore di cellule secernenti per contrastare l'infezione in quanto più efficaci in termini di capacità e cinetica di secrezione in relazione al loro stato di memorizzazione rispetto agli animali che non sono stati vaccinati.

I risultati del presente studio sostengono la differente modulazione del profilo citochinico in animali vaccinati con vaccino basato sulla proteina Cap di PCV2 ed animali non vaccinati in cui diffonde l'infezione e compare la patologia associata. Gli animali vaccinati affrontano l'infezione mostrando maggiore reattività cellulare legata all'IFN- $\gamma$  ed assenza di effetti regolatori negativi legati all'espressione di IL-10, così come l'assenza di stati infiammatori intensi a seguito dell'esposizione ed infezione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Blanchard P., Mahe D., Cariolet R., Keranflec'h A., Baudouard M.A., Cordioli P. et al. (2003) Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins, *Vaccine* 21, 4565-4575.
2. Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Franceschi V., Bottarelli E., Martelli P. (2010) Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (in stampa).
3. Chae J.S. e Choi K.S. (2010) Proinflammatory cytokine expression in the lung of pigs with porcine circovirus type 2-associated respiratory disease. *Res Vet Sci* (in stampa).
4. Crisci E., Ballester M., Dominguez J., Segalés J., Montoya M. (2010) Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol.* 136, 305-310.
5. Darwich L., Balasch M., Plana-Durán J., Segalés J., Domingo M., Mateu E. (2003a) Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol.* 84, 3453-3457.

6. Darwich L., Pié S., Rovira A., Segalés J., Domingo M., Oswald I.P., Mateu E. (2003b) Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* **84**, 2117-2125.
7. Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F. e Meng X.J. (2004) 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**, 6297-6303.
8. Ferrari L., Borghetti P., Gozio S., De Angelis E., Ballotta L., Smeets J., Blanchaert A., Martelli P. (2011). Evaluation of the immune response induced by intradermal vaccination by using a needle-less system in comparison with the intramuscular route in conventional pigs. *Res Vet Sci* **90**, 64-71.
9. Fisher, T., Buttner, M., Rziha, H.J. (2006). T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization. *Immunol* **101**, 378-387.
10. Fort M., M. Sibila, E. Pérez-Martin, M. Nofrarias, E. Mateu and J. Segalés. (2009a) 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**, 4031-4037.
11. Fort M., Fernandes L.T., Nofrarias M., Díaz I., Sibila M., Pujols J., et al. (2009b). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet Immunol Immunopathol*, **129**, 101-107.
12. Kekarainen T., Montoya M., Dominguez J., Mateu E., Segalés J. (2008a) Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol*. **124**, 41-49.
13. Kekarainen T., Montoya M., Mateu E., Segalés J. (2008b) Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* **89**, 760-765.
14. Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J., Allan G.M. (2010) Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol*. **136**, 185-193.
15. Kixmoller M., M. Ritzmann, M. Eddicks, A. Saalmuller, K. Elbers and V. Fachinger. (2008) Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* **26**, 3443-3451
16. Martelli P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Guazzetti S., Caleffi A., Borghetti P. (2011) One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet Microbiol* (in stampa).
17. Meerts P., Van Gucht S., Cox E., Vandebosch A., Nauwynck H.J. (2005) Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol*. **18**, 333-341.
18. Meissonnier G.M., Pinton P., Laffitte J., Cossalter A.M., Gong Y.Y., Wild C.P., Bertin G., Galtier P., Oswald I.P. (2008). Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**, 142-149.
19. Pérez-Martin E., Gómez-Sebastián S., Argilaguet J.M., Sibila M., Fort M., Nofrarias M., Kurtz S., Escribano J.M., Segalés J., Rodríguez F. (2010) Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine*. **28**, 2340-2349.
20. Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K. (2004). Deciphering the involvement of innate immune

- factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 199-216.
21. Shi K.C., Guo X., Ge X.N., Liu Q., Yang H.C. (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 140, 155-160.
  22. Steiner E., Balmelli C., Gerber H., Summerfield A., McCullough K. (2009) Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res* 5, 45.
  23. Stevenson L.S., McCullough K., Vincent I., Gilpin D.F., Summerfield A., Nielsen J., McNeilly F., Adair B.M., Allan G.M. (2006) Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 19, 189-195.
  24. von der Hardt K., Kandler M.A., Popp K., Schoof E., Chada M., Rascher W., Dotsch J. (2002). Aerosolized adrenomedullin suppresses pulmonary transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta gene expression in vivo. *Eur J Pharmacol* 457, 71-76.
  25. Wang X., Jiang P., Li Y., Jiang W., Dong X. (2007) Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 121, 215-224.
  26. Zhang H., Lunney J.K., Baker R.B., Opriessnig T. (2010) Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfectd with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Vet Immunol Immunopathol* (in stampa).

# DETERMINAZIONE DEL BIOSIEROTIPO E DEI CARATTERI DI VIRULENZA IN STIPITI DI *Yersinia enterocolitica* ISOLATI DA SUINI MACELLATI

## CHARACTERIZATION OF BIOSEROTYPE AND DETECTION OF VIRULENCE FACTORS IN *Yersinia enterocolitica* STRAINS ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIGS

FIGAROLLI B.M.<sup>1</sup>, GRADASSI M.<sup>1</sup>, BONARDI S.<sup>2</sup>, D'INCAU M.<sup>1</sup>,  
ALBORALI G. L.<sup>1</sup>, TAGLIABUE S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

<sup>2</sup> Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università di Parma

**Parole chiave:** *Yersinia enterocolitica*, biosierotipo, fattori di virulenza, suino pesante, macello, zoonosi

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*, bioserotype, virulence factors, fattening pigs, slaughterhouse, zoonosis

**Riassunto.** Lo scopo della presente indagine sperimentale è stato quello di valutare biosierotipo e caratteri di patogenicità di ceppi di *Yersinia enterocolitica* isolati da suini pesanti macellati in uno stabilimento sito in Lombardia nel periodo compreso tra Gennaio 2006 e Febbraio 2009. In totale sono stati caratterizzati 69 ceppi di *Yersinia* spp., di cui 37 (53,6%) sono stati identificati come *Y. enterocolitica*. Di questi, 32 (46,4%) sono risultati appartenenti al biotipo 1A e 5 (7,2%) al biosierotipo 4/O:3. È stata inoltre rilevata la presenza di specie di origine ambientale (*Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*). I 37 ceppi di *Y. enterocolitica* sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei geni di virulenza *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA* and *ystB*. Dei 5 stipiti di *Y. enterocolitica* 4/O:3, uno è risultato positivo per il gene *yadA*, e 4 per il gene *ail*. Tuttavia, la PCR multiplex applicata per la ricerca dei geni *inv*, *ystA* e *ystB* non ha fornito esiti definitivi e pertanto non è stato possibile stabilire la reale presenza di tali geni nei ceppi patogeni e non patogeni di *Y. enterocolitica*.

**Abstract.** The aim of this study was to characterize the bioserotype and to investigate the presence of virulence factors in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from fattening pigs, selected in one abbatoir of Northern Italy, during the three-year period January 2006 - February 2009. Sixty-nine *Yersinia* spp. strains were subjected to biochemical and serological typing: thirty-two *Y. enterocolitica* isolates (46.4%) belonged to biotype 1A and five (7.2%) to bioserotype 4/O:3. Environmental strains of *Yersinia* spp. were also detected (*Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*). The thirty-seven *Y. enterocolitica* strains were subjected to polymerase chain reaction (PCR) analysis to detect the presence of the *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA* and *ystB* virulence genes. Only one *Y. enterocolitica* strain of bioserotype 4/O:3 carried *yadA* gene and four *Y. enterocolitica* strains of bioserotype 4/O:3 carried *ail* gene. The results of multiplex PCR analysis for the detection of the *inv*, *ystA* and *ystB* genes were not definitive and it was not possible to establish the real presence of these virulence genes in *Y. enterocolitica* pathogenic and non-pathogenic strains.

### INTRODUZIONE

*Yersinia enterocolitica* è un importante agente di zoonosi di origine alimentare (Direttiva 2003/99/CE), considerato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) la terza causa di

malattia gastrointestinale trasmessa da alimenti in Europa, dopo *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (1). I Paesi del Nord Europa sono i più colpiti; in genere si registrano focolai sporadici, che si sviluppano in ambito familiare e che sono correlati alle abitudini alimentari. La trasmissione di *Y. enterocolitica* avviene attraverso l'ingestione di alimenti contaminati, in particolare la carne di suino cruda o poco cotta. La più comune manifestazione clinica è la gastroenterite, generalmente autolimitante, che colpisce in particolare i bambini. Nei soggetti adulti è possibile osservare forme extraintestinali di origine autoimmunitaria, quali artrite, eritema nodoso e sindrome di Reiter (2). Il suino pesante è considerato il principale serbatoio asintomatico dei biosierotipi 4/O:3 e 2/O:9 patogeni per l'uomo, che si localizzano a livello di amigdale e di contenuto ciecale.

La contaminazione delle carni suine avviene principalmente al macello, in quanto vi afferrisce un elevato numero di capi, provenienti da aziende suinicole caratterizzate da condizioni sanitarie e sistemi di gestione diversi tra loro e dove le carcasse vengono ampiamente manipolate. Le operazioni di eviscerazione, escissione della testa ed asportazione del pacchetto intestinale e del retto, se eseguite in maniera scorretta, favoriscono la diffusione del microorganismo attraverso il contenuto intestinale (feci) o gli organi della cavità orale (tonsille), portando alla contaminazione della carcassa. La carente applicazione di norme di corretta prassi igienica negli ambienti di lavorazione durante le operazioni di sezionamento, macinazione, rifilatura delle carni aumenta ulteriormente il rischio di contaminazione dei prodotti derivati (3; 4; 5; 6; 7).

## MATERIALI E METODI

**Campionamento.** I campioni di contenuto ciecale sono stati prelevati da 1440 suini pesanti del peso compreso tra i 150 ed i 180 Kg, afferenti da 33 aziende, presso uno stabilimento di macellazione sito in Lombardia, nel periodo compreso tra Gennaio 2006 e Febbraio 2009 e sono stati inviati all'IZSLER di Brescia. La metodica di prelievo (formazione di pool costituiti dal materiale intestinale di 5 soggetti ciascuno) non ha permesso di impostare studi di prevalenza, che quindi non rientrano nella presente indagine.

**Isolamento ed identificazione.** I campioni di contenuto ciecale sono stati sottoposti ad arricchimento a freddo in Acqua Peptonata Tamponata (APT) e posti ad incubare a temperatura di refrigerazione ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) per 10 giorni.

Trascorso il periodo di incubazione, gli arricchimenti, sottoposti a trattamento di alcalinizzazione con KOH allo 0,5%, sono stati seminati su terreno CIN agar (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina), selettivo per *Yersinia* e su terreno MacConkey, selettivo per le Enterobatteriacee. Le piastre sono state incubate a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 24-48 ore. Una volta eseguita la piastratura, gli arricchimenti sono stati nuovamente incubati per altri 10 giorni e successivamente seminati sui terreni sopra citati. Tale procedura è stata ripetuta fino ad un massimo di tre volte. Le colonie riconducibili morfologicamente a *Yersinia* sono state sottoposte a test di prima identificazione (tabella 1).

**Tabella 1.** *Esito delle prove di conferma*

**Table 1.** *Results of identification tests*

TEST	ESITO
Gram	Negativo
Catalasi	Positivo
Ossidasi	Negativo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Gas dal glucosio	Negativo
Glucosio	Positivo
Lattosio	Negativo
Ureasi	Positivo
Idrolisi dell'esculina	Negativo
Mobilità a $26^{\circ}\text{C}\pm 1$	Positivo
Mobilità a $37^{\circ}\text{C}\pm 1$	Negativo
Enterotube™ II (BBL Enterotube™ II, BD)	

I ceppi identificati come appartenenti al genere *Yersinia* spp. sono stati stoccati a -20°C, in cryotubes contenenti terreno Tripticase Soy Broth (TSB) addizionato del 10% di glicerolo.

**Determinazione del biosierotipo.** Le prove di tipizzazione biochimica e sierologica sono state condotte su 69 ceppi identificati in precedenza come *Yersinia* spp. Il ceppo da tipizzare, scongelato, è stato seminato in brodo Brain Heart Infusion (BHI) ed incubato a 30±1°C per 24-48 ore. Si è proceduto quindi alla piastratura della coltura batterica su MacConkey agar, incubato a 30±1°C per 24 ore, per ottenere colonie isolate, da sottoporre a colorazione di Gram per verificarne la purezza ed a trapianto in terreno Kligler Iron Agar, per valutare la mancata produzione di gas e di idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S), dopo incubazione a 30±1°C per 48-72 ore. La subcoltura ottenuta su Kligler è stata in parte stoccata a -20°C ed in parte destinata alla tipizzazione biochimica ed a quella sierologica, mediante agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando i sieri del commercio O:1,2; O:3, O:5; O:8; O:9 (*Yersinia enterocolitica* ANTISERA SET, Denka Seiken Co., LTD.). Il profilo biochimico è stato determinato ricorrendo a prove in macrometodo, secondo lo schema di Wauters (8) (lipasi TW80, esculina ESC, pirazinamidasi PYR, indolo IND, salicina SAL, sorbosio SORB, trealosio TRE, xilosio XIL, nitrati NIT, ornitina ORN, Voges-Proskauer VP, melibiosio MEL, raffiniosio RAF, ramnosio RHA, saccarosio SAC e mucato MUC) e in micrometodo (API 20E e API 50CHE, bioMérieux), alla temperatura di 30±1°C. La lettura delle prove in macrometodo è stata eseguita ad intervalli di 24-48-72 ore, fino a 7 giorni. I sistemi miniaturizzati API 20E e API 50CHE sono stati letti a 24 ore e, dopo aggiunta dei reattivi necessari, a 48 ore.

**Determinazione dei fattori di virulenza.** I geni codificanti per i fattori di virulenza di *Y. enterocolitica*, determinati mediante PCR sono stati *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* e descritti in tabella 2.

**Tabella 2.** Fattori di virulenza di *Y. enterocolitica*  
**Table 2.** *Y. enterocolitica* virulence factors

LOCALIZZAZIONE	GENE	PROTEINA CODIFICATA	FUNZIONE
<b>PLASMIDICA</b>  Plasmide pYV (70 kb)	<i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesin (YadA)	Adesione alle cellule dell'epitelio intestinale; inibizione dell'attivazione del sistema del complemento (9, 10, 11).
<b>CROMOSOMIALE</b>	<i>inv</i>	Invasina (Inv)	Adesione e invasione degli enterociti; penetrazione del batterio nelle placche del Peyer (12).
	<i>ail</i>	Attachment Invasion Locus (Ail)	Resistenza all'attività battericida del siero (11, 13).
	<i>ystA</i> (stipiti patogeni)	Enterotossina (Yst)	Il ruolo nell'induzione della diarrea è controverso, ma sembra favorire l'accumulo di fluidi nel lume intestinale (14, 15).
	<i>ystB</i> (stipiti non patogeni)		

L'estrazione del DNA batterico è stata eseguita a partire dalla coltura batterica pura, coltivata in brodo, dopo 24 ore di incubazione. La successiva reazione di PCR è stata eseguita su un volume finale di 50 µl, costituito da 5 µl di DNA e 45 µl di Master Mix, composta da tampone Taq Buffer 10 X (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Fermentas), dNTPs 10 mM (Eppendorf), Taq Polymerase 5 U/µl (Fermentas). Le quantità dei singoli reagenti utilizzati per la preparazione della Master Mix variano a seconda del protocollo applicato. Per ogni PCR sono stati utilizzati controlli positivi in numero variabile, a seconda del gene ricercato.

Ricerca del gene plasmidico *yadA*. Per l'amplificazione del gene plasmidico *yadA* (238 bp) sono stati impiegati i seguenti primers (Sigma Genosys): *21-mer* forward (5'-CAG TAT TGA CCAAAA CCA GGC-3') e *17-mer* reverse (5'-TGT CGA GGT TAC AAG TC-3'). Il programma di PCR utilizzato segue le impostazioni descritte nel protocollo di Blais e Philippe (16).

Ricerca del gene cromosomiale *ail*. Per l'amplificazione del gene cromosomico *ail* (315 bp) sono stati impiegati i seguenti primers: *ail*-forward (5'-TAA TGT GTA CGC TGC GAG-3') ed *ail*-reverse (5'-GAG GTC TTA CTT GCA CTG-3'). Il programma di PCR utilizzato segue, invece, le impostazioni descritte nel protocollo di Thoerner e collaboratori (17).

Ricerca dei geni cromosomiali *inv*, *ystA* e *ystB*. La PCR multiplex messa a punto per la ricerca dei geni cromosomici *inv* (183 bp), *ystA* (79 bp) e *ystB* (146 bp), utilizza le seguenti coppie di primers: *inv*-forward (5'-CGG TAC GGC TCA AGT TAA TCT G-3') e *inv*-reverse (5'-CCG TTC TCC AAT GTA CGT ATC C-3'); *ystA*-forward (5'-ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G-3') e *ystA*-reverse (5'-CCA ATC ACT ACT GAC TTC GGC T-3'); *ystB*-forward (5'-GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG-3') e *ystB*-reverse (5'-GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC-3'). Anche in questo caso, il programma di PCR utilizzato segue le impostazioni descritte nel protocollo di Thoerner e collaboratori (17).

Corsa elettroforetica. I diversi prodotti PCR sono stati separati in gel di agarosio al 2%, in tampone TAE 50X, ad un voltaggio di 90 V per 90 minuti, per i geni *yadA* ed *ail*. Per la rilevazione dei prodotti PCR *inv*, *ystA*, *ystB* è stato impostato un voltaggio di 70 V per 3 ore. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio e l'amplificato è stato visualizzato ai raggi UV. Per verificare le dimensioni dei frammenti amplificati è stato utilizzato il marker MassRuler™ DNA Ladders, Low Range, ready-to-use (Fermentans), che permette di visualizzare bande comprese tra 1031 bp e 80 bp.

## RISULTATI

**Determinazione del biosierotipo.** Le prove di tipizzazione biochimica e sierologica hanno permesso di definire correttamente la specie, il biotipo e il sierotipo dei 69 ceppi batterici, identificati in fase di primo isolamento come *Yersinia* spp. La biotipizzazione ha identificato 32 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A (46,38%), 5 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 4 (7,25%), 23 ceppi di *Y. frederiksenii* (33,34%), 5 ceppi di *Y. mollaretii* (7,25%), 2 ceppi di *Y. bercovieri* (2,90%), 1 ceppo di *Y. kristensenii* (1,45%) e 1 ceppo di *Y. intermedia* (1,45%) (tabelle 3 e 4). La tipizzazione sierologica ha fornito i seguenti risultati: 35 ceppi (50,72%) non hanno mostrato reattività nei confronti dei sieri testati e sono stati definiti non agglutinanti (N.A.); 2 ceppi (2,90%) hanno reagito con il siero O:1,2; 2 ceppi (2,90%) hanno presentato reazione crociata nei confronti dei sieri O:1,2 e O:3; 14 ceppi (20,29%) sono risultati positivi al siero O:3; 9 ceppi (13,04%) sono risultati positivi al siero O:5; 5 (7,25%) ceppi hanno reagito con il siero O:8; 2 ceppi (2,90%) hanno dato reazione crociata ai sieri O:8 e O:9 (tabella 5). In tabella 6 viene dettagliata la correlazione tra il biotipo ed il sierotipo dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati. Nello specifico, 17 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A sono risultati non agglutinanti (N.A.); 1 ceppo di *Y. enterocolitica* biotipo 1A ha reagito con il siero O:1,2; 9 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A hanno reagito con il siero O:5; 5 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A hanno reagito con il siero O:8. Nessun ceppo di *Y. enterocolitica* 1A ha reagito con i sieri O:3 e O:9. Tutti i ceppi identificati come *Y. enterocolitica* biotipo 4 sono risultati positivi al siero O:3. Gli esiti della tipizzazione sierologica condotta sugli stipti di *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia* non sono stati riportati, in quanto irrilevanti in questo studio.

**Tabella 3.** Biotipizzazione dei ceppi di *Yersinia* spp.  
**Table 3.** Characterization of *Yersinia* spp. strains

SIGLA	<i>Y. enterocolitica</i> 1A	<i>Y. enterocolitica</i> 4	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>
TW80	+	-	+/-	-	-	+	+/-
ESC	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-
PYR	+	-	+	+	+	+	+
IND	+	-	+/-	-	-	+	+/-
SAL	+	-	+	+/-	+/-	+	-
SOR	+	+	+	-	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+
XIL	+	-	+	+	+	+	+
NIT	+	+	+	+	+	+	+
ORN	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	-	-	+	-
MEL	-	-	-	-	-	+/-	-
RAF	-	-	-	-	-	+/-	-
RHA	-	-	+	-	-	+/-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	-
MUC	-	-	+	+	+	+	+/-

**Tabella 4.** Specie di *Yersinia* spp. isolate  
**Table 4.** *Yersinia* spp. strains

Specie	Freq.	Percent. (%)	Cum.
<i>Y. bercovieri</i>	2	2.90	2.90
<i>Y. enterocolitica</i> 1A	32	46.38	49.28
<i>Y. enterocolitica</i> 4	5	7.25	56.52
<i>Y. frederiksenii</i>	23	33.34	89.86
<i>Y. intermedia</i>	1	1.45	91.30
<i>Y. kristensenii</i>	1	1.45	92.75
<i>Y. mollaretii</i>	5	7.25	100.00
Totale	69	100.00	

**Tabella 5.** Sierotipi di *Yersinia* spp. identificati  
**Table 5.** *Yersinia* spp. serotypes

Specie	Freq.	Percent. (%)	Cum.
N.A.	35	50.72	50.72
O:1,2	2	2.90	53.62
O:1,2-O:3	2	2.90	56.52
O:3	14	20.29	76.81
O:5	9	13.04	89.86
O:8	5	7.25	97.10
O:8-O:9	2	2.90	100.00
Totale	69	100.00	

**Tabella 6.** Sierotipizzazione di *Y. enterocolitica*  
**Table 6.** Serotyping of *Y. enterocolitica*

<i>Y. enterocolitica</i>	SIEROTIPO						
		NA	O:1,2	O:3	O:5	O:8	O:9
Biotipo	1A	17	1	/	9	5	/
	4	/	/	5	/	/	/

**Determinazione dei fattori di virulenza.** La ricerca dei fattori di virulenza è stata condotta sui 37 ceppi identificati come *Y. enterocolitica*. Come riassunto in tabella 7, un solo ceppo di *Y. enterocolitica* biosierotipo 4/O:3 è risultato positivo al gene plasmidico *yadA* (Figura 1), mentre quattro ceppi di *Y. enterocolitica* biosierotipo 4/O:3 ed un ceppo identificato come *Y. enterocolitica* biosierotipo 1A/O:5 sono risultati positivi al gene cromosomiale *ail* (Figura 2 e 3). La PCR multiplex per la ricerca dei geni cromosomiali *inv*, *ystA*, *ystB* non ha dato risultati attendibili.

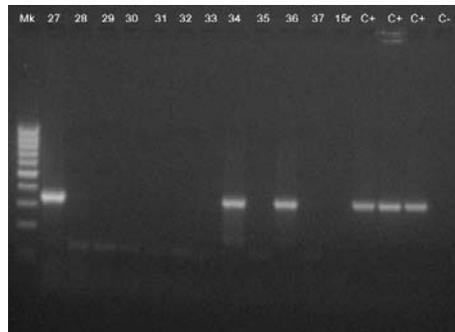
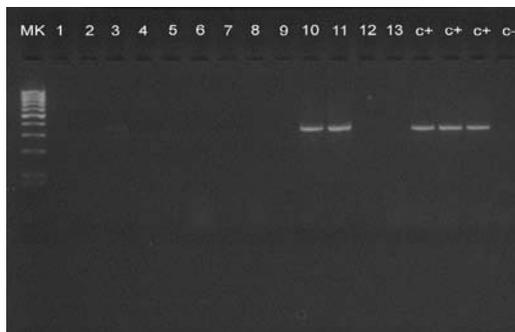
**Figura 1.** PCR positiva per la ricerca del gene *yadA* (238 pb)

**Picture 1.** Positive PCR for the detection of *yadA* gene (238 pb)



**Figura 2 e 3.** PCR positiva per la ricerca del gene *ail* (351 pb)

**Picture 2 and 3.** Positive PCR for the detection of *ail* gene (351 pb)



**Tabella 7.** Esiti ottenuti in PCR per la ricerca dei geni di virulenza  
**Table 7.** PCR results for the detection of virulence genes

<i>Y. enterocolitica</i>		Geni di virulenza	
biotipo	sierotipo	<i>yadA</i>	<i>ail</i>
4	O:3	1	4
1A	O:5	negativo	1

## DISCUSSIONE

*Y. enterocolitica* è una specie batterica piuttosto complessa dal punto di vista della classificazione in biotipi e sierotipi. Per questa ragione la biotipizzazione, associata alla sierotipizzazione, sebbene indaginosa, è ancora oggi necessaria per distinguere in maniera chiara stipiti patogeni e non patogeni. Tuttavia, esistono difficoltà in ambito diagnostico, legate soprattutto alla fase di isolamento del microrganismo. In questo studio, la bassa percentuale di ceppi patogeni di *Y. enterocolitica* 4/O:3 (7,25%) e l'assenza di isolati appartenenti al biosierotipo 2/O:9, in contrasto con l'elevata percentuale di stipiti non patogeni riferibili al biotipo 1A (46,38%) ed alle specie di origine ambientale (46,39%), è imputabile in primo luogo al mancato prelievo delle amigdale, sede d'elezione per la ricerca dei biosierotipi patogeni. Inoltre, l'utilizzo dell'arricchimento a freddo in fase di isolamento, che sfrutta la capacità di *Y. enterocolitica* di crescere a 4°C, sebbene ampiamente utilizzato, presenta limiti notevoli, quali i lunghi tempi di risposta e soprattutto la capacità di favorire la crescita di stipiti non patogeni. In bibliografia, sono state, quindi, proposte metodiche alternative che prevedono l'isolamento a partire da uno striscio diretto del campione su terreni selettivi CIN o SSDC (Salmonella-Shigella Deoxycholate Calcium chloride) (18) e l'impiego di brodi di arricchimento (Peptone Sorbitolo e Sali Biliari PSB, Irgasan, Ticarcillina, Chlorate ITC, bile-ossalato-sorbosio BOS) posti ad incubare a temperature più elevate (22-25°C), al fine di migliorare la sensibilità analitica soprattutto nei confronti degli stipiti patogeni di *Y. enterocolitica* presenti in un campione policontaminato (2).

L'applicazione di protocolli PCR per la ricerca del gene plasmidico *yadA* e per i geni cromosomiali *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* ha permesso di valutare i caratteri di virulenza dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati dai suini. La presenza del gene *yadA*, principale indicatore di patogenicità, in un solo ceppo di *Y. enterocolitica* 4/O:3 è spiegabile in quanto il plasmide è un elemento genetico instabile, che viene facilmente perso dal microrganismo sottoposto a ripetute semine su terreni colturali. La mancata rilevazione del gene *yadA* non deve quindi essere interpretata come assenza di patogenicità del ceppo in esame, ma come un possibile esito falsamente negativo (19; 2). Il rilevamento del gene *ail* negli altri 4 stipiti di *Y. enterocolitica* 4/O:3 conferma quanto stabilito da altri autori, secondo i quali la presenza di tale frammento cromosomiale è un buon indicatore della patogenicità (13; 16; 20). La presenza del gene *ail* in un ceppo di *Y. enterocolitica* 1A/O:5 indica, invece, la possibile presenza di mutazioni inattive nel genoma di stipiti non patogeni.

L'applicazione della PCR multiplex per la ricerca dei geni di virulenza *inv*, *ystA* e *ystB* ai ceppi isolati in questo studio non ha permesso di affermare con certezza se gli stipiti patogeni biosierotipo 4/O:3 e i non patogeni biosierotipo 1A presentassero o meno tali geni.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio servono essenzialmente per approfondire le conoscenze sulle caratteristiche dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati dal contenuto intestinale di suini macellati nel nostro paese, con particolare riferimento alla determinazione dei caratteri associati alla virulenza. Tuttavia si ritiene indispensabile la stesura di protocolli di isolamento più sensibili che, affiancati a metodiche di biologia molecolare idonee all'individuazione dei geni cromosomiali *inv*, *ystA* e *ystB*, rendano possibile lo studio approfondito dei caratteri di patogenicità di tali microrganismi. Tali strumenti migliorerebbero le potenzialità diagnostiche e renderebbero più semplice lo studio di eventuali focolai tossinfettivi di yersiniosi umana dovuti al consumo di prodotti carnei di origine suina.

## RINGRAZIAMENTI

Si rivolge un particolare ringraziamento al personale tecnico del Reparto di Batteriologia dell'IZSLER per il supporto e la collaborazione offerta.

Questa indagine sperimentale è stata condotta nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente PRC2007007 "Indagine sui principali patogeni enterici del suino in accrescimento con potenziale risvolto zoonosico", in corso presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER).

## BIBLIOGRAFIA

1. EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Technical specifications for harmonised national surveys on *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs. *EFSA Journal*, **7** (11): 1374
2. Savin C., Carniel E. (2008). Les diarrhées d'origine bactérienne: le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **400**: 49-58
3. Andersen J.K., Sørensen R., Glensbjerg M. (1991). Aspect of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 231-238
4. de Boer E., Nouws J.F.M. (1991). Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**: 375-378
5. Fredriksson-Ahomaa M., Hallanvuo S., Korte T., Siitonen A., Korkeala H. (2001). Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine source. *Epidemiol. Infect.*, **127**: 37-47
6. Bowman A.S., Glendening C., Wittum T.E., LeJeune J.T., Stich R.W., Funk J.A. (2007). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms. *J. Food Prot.*, **70** (1): 11-16
7. Laukkanen R., Ortiz Marti P., Siekkinen K.M., Ranta J., Maijala R., Korkeala H. (2009). Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. *Foodborne Pathog. Dis.*, **6** (6): 681-688
8. Wauters G., Kandolo K., Janssens M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. In: *Contrib. Microbiol. Immunol.* Karger, Basel 1987, **9**: 14-21
9. China B., Sory M.P., N'Guyen B.T., De Bruyere M., Cornelis G.R. (1993). Role of YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.*, **61** (8): 3129-3136
10. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M.P., Stainier I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **62** (4): 1315-1352
11. Biedzka-Sarek M., Venho R., Skurnik M. (2005). Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.*, **73** (4): 2232-2244
12. Grass I.G.A., Bohn E., Müller Y., Bühler O.T., Autenrieth I.B. (2003). Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasion beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.*, **293** (1): 41-54
13. Bliska J.B., Falkow S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3561-3565
14. Delor I., Kaeckenbeek A., Wauters G., Cornelis G.R. (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* encoding the heat-stable enterotoxin, and the prevalence of the gene among pathogenic and non-pathogenic *Yersinia*. *Infect. Immun.*, **58**: 2983-2988
15. Ramamurthy T., Yoshino K., Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T., Fukushima H., Takeda T. (1997). The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.*, **23**: 189-200

16. Blais B.W., Phillippe L.M. (1995). Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. *Food Control*, **6** (4): 211-214
17. Thoerner P., Kingombe C.I.B., Bögli-Stuber K., Bissig-Choisat B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T. (2003). PCR detection of virulent genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (3): 1810-1816
18. Van Damme I., Habib I., De Zutter L. (2010). *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. *Food Microbiol.* , **27**: 158–161
19. Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16** (2): 220-229
20. Platt-Samoraj A., Ugorski M., Szweda W., Szczerba-Turek A., Wojciech K., Procajlo Z. (2006). Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. *J. Vet. Med. B.*, **53**: 341-346

# DINAMICA DELL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN 4 ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI A CICLO CHIUSO

## *DYNAMICS OF Mycoplasma.hyopneumoniae INFECTION IN 4 SWINE ITALIAN FARROW TO FINISH HERDS*

GIACOMINI E. <sup>1</sup>, FERRO P. <sup>2</sup>, NASSUATO C. <sup>1</sup>, SALOGNI C. <sup>1</sup>  
ALBORALI L. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, <sup>2</sup>Elanco Italia

**Parole chiave:** Mycoplasma Hyopneumoniae, tamponi nasali, nested-PCR, suino  
**Key words:** Mycoplasma Hyopneumoniae, nasal swabs, nested-PCR, pig

**Riassunto.** La dinamica e la diffusione di *M. hyopneumoniae* può assumere caratteri diverse in funzione della tipologia d'allevamento, della gestione e della corretta applicazione delle principali misure di profilassi igienico sanitaria.

Lo studio è stato condotto in 4 allevamenti a ciclo chiuso in cui non era stata utilizzata la vaccinazione verso *M.hyopneumoniae* negli ultimi 24 mesi. E' stato applicato un protocollo di campionamento che ha previsto il prelievo di campioni di sangue e di tamponi nasali in 10 categorie di età. In tutti i 4 allevamenti è stata dimostrata una attiva circolazione dell' infezione da *M.hyopneumoniae* e con caratteristiche di diffusione differenti a seconda dell'allevamento e dei gruppi di animali. I suini appartenenti alle categorie di età comprese tra 4 e 16 settimane sono risultati siero negativi. La siero conversione è stata dimostrata nei suini appartenenti alle categorie di 16 e 24 settimane mentre la presenza di *M.hyopneumoniae* nei tamponi nasali è stata osservata in suini di 12 e 16 settimane. A fronte della comparsa di anticorpi in gruppi di età di 16 e 24 settimane rispettivamente negli allevamenti 2,4 e 1,3 la presenza di *M.hyopneumoniae* è stata messa in evidenza più precocemente in tamponi nasali di suini di 12 settimane negli allevamenti 3e 4, di 16 e 20 settimane nelle aziende 2 e 1.

L' utilizzo di n PCR su tamponi nasali in animali vivi in combinazione con l'esame sierologico ha consentito di conoscere meglio la dinamica dell' infezione nei 4 allevamenti. A fronte di una positività sierologica tardiva l' infezione da *M. hyopneumoniae* è risultata essere presente nelle fasi di svezzamento e magronaggio e gruppi di suinetti di differenti età e dello stesso allevamento si sono comportati in maniera diversa.

**Abstract.** The dynamic and the diffusion of the *M. hyopneumoniae* can assume the different aspects depending on the type of breeding, on the management end on the correct application of the sanitary levels.

The study has been conducted in 4 herds (close cycle) where vaccine were not used for *M. hyopneumoniae* in the last 24 months. Protocol of blood sampling and nasal swabs has been applied in 10 age groups. In all 4 herds an active circulation of the *M. hyopneumoniae* infection was demonstrated and with different diffusion characteristics depending on the farms and of the animals groups. The swine belonging to the age groups between 4 and 16 weeks resulted negative serum. The serum conversion was demonstrated in swine belonging to groups of 16-24 weeks while the presence of *M. hyopneumoniae* in the nasal swabs was observed in pigs of 12 an 16 weeks. With the appearance of antibodies in age groups of 16-24 weeks respectively in the herds 2,4 and 1,3 the presence of *M. hyopneumoniae* was revealed earlier in nasal swabs of swine of 12 weeks in the herds 3 and 4 of 16 and 20 weeks in the farms 2 and 1.

The use of n PCR an nasal swabs in live animals in combination with serum tests permitted better understanding the dynamics of the infection in the herds 4. in front of a delayed positive serum the *M. hyopneumoniae* infection is present in the phase of weaning and post-weaning and swine groups of different ages of the same herd behaved in a different way.

## INTRODUZIONE

La conoscenza della dinamica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* in un allevamento rappresenta uno strumento importante e strategico al fine di adottare specifiche misure di biosicurezza e dell'impostazione di programmi di trattamenti antibatterici e vaccinali.

*M. Hyopneumoniae* è agente eziologico responsabile della polmonite enzootica suina, patologia altamente diffusa e con importanti ricadute sul bilancio economico dell'azienda. Questo microrganismo è considerato uno "door opener" rispetto ad altri patogeni respiratori di infezione secondaria (Cipriani et al., 1994) e viene spesso coinvolto anche nel complesso della sindrome post svezzamento associato a PCV2 (Thacker 2006, Opriessnig et al., 2004).

Le patologie respiratorie sono fra le principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino e il ruolo di *M. hyopneumoniae* si è consolidato negli ultimi anni (Sorensen et al., 2006). I siti elettivi di replicazione di questo patogeno sono la mucosa tracheale, bronchiale e bronchiolare e la colonizzazione dell'epitelio respiratorio ciliato risulta essere un pre requisito al fine dello scatenarsi della patologia (Blanchard et al., 1992, Kwon et al., 2002).

Numerosi sono i fattori coinvolti nella trasmissione del patogeno in allevamento e comprendono la tipologia dell'allevamento, la condizione immunitaria delle madri, il livello di trasferimento degli anticorpi dalla scrofa al suinetto, la gestione e il management aziendale. *M. hyopneumoniae* è molto diffuso negli allevamenti suini e la sua prevalenza media fra animali dello stessa azienda è considerata molto variabile e, a seconda della realtà, si attesta fra il 30 e l'80 % (Sibila et al., 2004, Meyns et al., 2010, Fraile et al., 2010, Grosse Belaige et al., 2009, Hansen et al., 2010, Ji et al., 2009)

Queste considerazioni hanno contribuito al successo della vaccinazione verso *M. hyopneumoniae* che negli ultimi anni è diventata una pratica comune nelle maggior parte delle realtà suinicole del mondo (Maes et al., 2008).

La conferma della presenza di *M. hyopneumoniae* in un allevamento viene effettuata normalmente attraverso gli esami sierologici e indagini di biologia molecolare atte a mettere in evidenza il DNA del microorganismo in campioni di polmone prelevati al macello o in soggetti deceduti e sottoposti ad esame anatomico patologico.

ELISA è il test sierologico più comunemente usato per la ricerca di anticorpi verso *M. hyopneumoniae* e i risultati possono essere espressi in valori OD o S/P. Al fine di valutare la dinamica dell'infezione è importante considerare la siero prevalenza e l'andamento nel tempo dei valori SP nelle differenti categorie di età. I modelli di campionamento longitudinale sono in grado di fornire indicazioni specifiche per i singoli animali anche se la complessità organizzativa e la loro durata nel tempo ne condizionano l'utilizzo nella routine diagnostica.

L'isolamento di *M. hyopneumoniae* tramite coltura risulta essere la metodica "gold standard", ma, considerate le difficoltà di crescita in vitro, le metodiche più utilizzate sono la n PCR e la RT PCR (Artiushin et al., 1993, Sibila et al., 2009).

La tipologia e la metodica di campionamento sono molto importanti al fine dei risultati che ci si possono attendere. I migliori risultati si ottengono utilizzando il lavaggio tracheo bronchiale e tamponi tracheo-bronchiali mentre con il prelievo di tamponi nasali si riducono le possibilità di evidenziare l'antigene. La n PCR è in grado di fornire risultati ottimi se applicata a lavaggi broncoalveolari (BALS) e tamponi bronchiali. (Fablet et al., 2009). Si considera che infettando sperimentalmente suini SPF con i lavaggi e tamponi tracheo bronchiali si è in grado di evidenziare una positività rispettivamente del 70 % e del 67 % dei suini mentre con i tamponi nasali si può arrivare ad una positività del 13%.(Marois et al., 2007).

L'abbinamento della sierologia su modelli di campionamento cross sectional alla n PCR su tamponi nasali rappresenta il protocollo applicabile in allevamento in grado di fornire informazioni diagnostiche e di dinamica dell'infezione nei diversi gruppi e categorie di età ( Calsamiglia et al.,1999 ) Il ritrovamento del microorganismo nei tamponi nasali indica con maggior accuratezza il momento dell'infezione mentre la sierologia evidenzia un contatto pregresso con l'antigene avvenuto in tempi variabili da 4 a 8 settimane prima ( Mattson et al , 1995 , Calsamiglia et al . ,1999 )

Numerosi sono gli studi che hanno correlato l'infezione da *M.hypopneumoniae* con fattori ambientali e gestionali. E noto che un'elevata rimonta , le provenienze multiple di soggetti destinati allo svezzamento o all' ingrasso , il flusso continuo, l'elevata densità di animali favoriscono la diffusione dell'infezione mentre la pratica del tutto pieno/tutto vuoto o la produzione in sistemi a tre siti sono in grado di contenere l'infezione

L'obiettivo di questo lavoro è quello di determinare la dinamica dell'infezione da *M.hypopneumoniae* in 4 allevamenti a ciclo chiuso in cui da almeno 2 anni non era praticata la vaccinazione attraverso l'applicazione di un protocollo di campionamento di sangue su modello cross sectional e di tamponi nasali esaminanti con n PCR.

## **MATERIALI E METODI**

### **Selezione degli allevamenti**

Sono state selezionate 4 aziende a ciclo chiuso che da almeno 24 mesi non utilizzavano vaccini per *Mycoplasma Hypopneumoniae*. L'azienda n 1 aveva una consistenza di circa 2000 scrofe con svezzamento esterno, la n 2 di 1000, la 3 aveva una scrofaia composta da 700 capi e infine la 4 da 500 scrofe.

Di seguito vengono riportati i trattamenti antibatterici utilizzati nelle aziende

Azienda 1: azienda che utilizza Tiamulina durante lo svezzamento e magronaggio 3 giorni a settimana

Azienda 2 : azienda che utilizza nei sottoscrofa amoxicillina e colistina nel mangime

Azienda 3 : azienda che utilizza nei sottoscrofa amoxicillina e colistina nel mangime

Azienda 4 : azienda con sito 2 esterno che utilizza Tilosina e sulfamidico nei primi 60 giorni di vita dei suini .

### **Protocollo di campionamento**

In ogni azienda sono stati selezionati 10 gruppi di suini di età diverse e al loro interno sono stati scelti casualmente 10 soggetti per categoria appartenenti ad almeno 3 box.

Il protocollo utilizzato è stato il medesimo per ciascuna azienda e prevedeva quanto segue :

- 1 settimana di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 4 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 8 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 12 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 16 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 20 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 24 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 28 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 32 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali
- 36 settimane di vita: 10 campioni di sangue e 5 tamponi nasali

In questo modo in tutti i 4 allevamenti sono stati prelevati 100 campioni di sangue e 50 tamponi nasali.

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare in provette senza anticoagulante

I tamponi nasali sono stati eseguiti utilizzando un tampone cotonato monouso per ogni narice posto in una provetta contenente liquido di trasporto.

Tali campioni sono stati identificati singolarmente, trasportati a temperatura di refrigerazione, registrati e processati

### **Indagini di laboratorio**

#### **ELISA**

Il sangue è stato centrifugato a 1500 giri x 3 minuti e il siero ottenuto è stato stoccato a  $-20^{\circ}$  per essere esaminato contemporaneamente. La ricerca degli anticorpi verso *M. hyopneumoniae* è stata effettuata mediante test ELISA blocking (R. F. Ross 1999). HerdCeck *M. hyopneumoniae*, IDEXX Laboratories Secondo le indicazioni sono stati riconosciuti positivi i soggetti con valore SP  $> 0,4$  negativi quelli  $< 0,3$ , e sospetti quelli fra 0,3 e 0,4.

Oltre alla determinazione della sieropositività e della siero prevalenza è stata effettuata anche una valutazione dei valori SP medi nelle diverse categorie di età. In questa elaborazione sono stati compresi tutti i valori SP indipendentemente dalla soglia di positività.

#### **n-PCR**

I tamponi nasali sono stati preparati utilizzando per l'estrazione una sospensione ottenuta ponendo il tampone in PBS sterile. La valutazione della contaminazione durante le procedure di estrazione sono state testate inserendo un controllo negativo costituito da PBS in ogni gruppo di campioni processati L'identificazione del DNA di *M. hyopneumoniae* è stata effettuata mediante Nested PCR modificata usando primers e condizioni descritte precedentemente (Calsamiglia et al 1999 Sibila et al., 2004).

I tamponi nasali sono stati analizzati singolarmente e classificati in n PCR positivi o negativi.

#### **Analisi statistica**

Sono stati stimati i valori di siero prevalenza, del titolo medio anticorpale e della prevalenza di infezione con i rispettivi intervalli di confidenza al 95% per ciascuna azienda e per categoria di età entro azienda. Inoltre sono stati stimati i valori di siero prevalenza e di prevalenza di infezione per ciascuna categoria di età rispettivamente mediante un modello lineare e un modello logistico a effetti misti con effetto random l'azienda.

### **RISULTATI**

#### **ELISA**

I risultati delle indagini ELISA effettuate in tutti i 4 allevamenti espressi in termini di siero prevalenza per categoria e azienda sono riportati nella tabella 1. I risultati sono espressi come numero dei positivi e negativi con la relativa percentuale di prevalenza e indice di confidenza del 95%.

**TABELLA 1:** *siero prevalenza per azienda e categoria*  
**TABLE 1:** *Herd and category seroprevalence*

<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Sieroprevalenza</i>	<i>IC95%</i>
1	1	0	10	0	0 – 30,85
1	4	0	10	0	0 – 30,85
1	8	0	10	0	0 – 30,85
1	12	0	10	0	0 – 30,85
1	20	0	10	0	0 – 30,85
1	24	1	9	10	0,25 – 44,5
1	28	1	9	10	0,25 – 44,5
1	32	3	7	30	6,67 – 65,25
1	36	2	8	20	2,52 – 55,61
2	1	0	10	0	0 – 30,85
2	4	0	10	0	0 – 30,85
2	8	0	10	0	0 – 30,85
2	12	0	10	0	0 – 30,85
2	16	1	9	10	0,25 – 44,5
2	20	0	10	0	0 – 30,85
2	24	8	2	80	44,39 – 97,48
2	28	4	5	44,44	13,7 – 78,8
2	32	8	2	80	44,39 – 97,48
2	36	9	1	90	55,5 – 99,75
3	1	0	10	0	0 – 30,85
3	4	0	10	0	0 – 30,85
3	8	0	10	0	0 – 30,85
3	12	0	10	0	0 – 30,85
3	16	0	10	0	0 – 30,85
3	20	0	10	0	0 – 30,85
3	24	5	5	50	18,71 – 81,29
3	28	1	9	10	0,25 – 44,5
3	32	0	10	0	0 – 30,85
3	36	2	8	20	2,52 – 55,61
4	1	1	9	10	0,25 – 44,5
4	4	0	10	0	0 – 30,85
4	8	0	10	0	0 – 30,85
4	12	0	10	0	0 – 30,85
4	16	2	8	20	2,52 – 55,61
4	20	4	6	40	12,16 – 73,76
4	24	6	4	60	26,24 – 97,84
4	28	7	3	70	34,75 – 93,33
4	32	4	6	40	12,16 – 73,76
4	36	5	5	50	18,71 – 81,29

La siero prevalenza e il relativo intervallo di confidenza del 95% nelle diverse aziende è riportata nella tabella 2

**TABELLA 2:** siero prevalenza per azienda

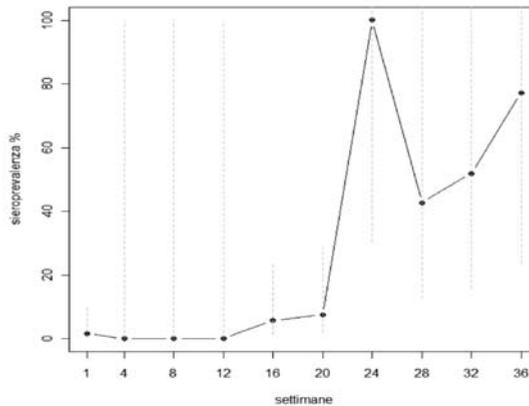
**TABLE 2:** herd seroprevalence

<i>Azienda</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Sieroprevalenza</i>	<i>IC95%</i>
1	7	83	7,78	3,18 – 15,37
2	30	69	30,3	21,47 – 40,35
3	8	92	8	3,52 – 15,16
4	29	71	29	20,36 – 38,93

Nel Grafico 1 è riportato l'andamento della siero prevalenza in relazione esclusivamente alla diversa categoria di età degli animali.

**GRAFICO 1:** siero prevalenza per categoria stimata mediante modello a effetti misti con fattore random d'azienda.

**GRAPH 1:** seroprevalence category estimated by mixed effects model with random factor for herd



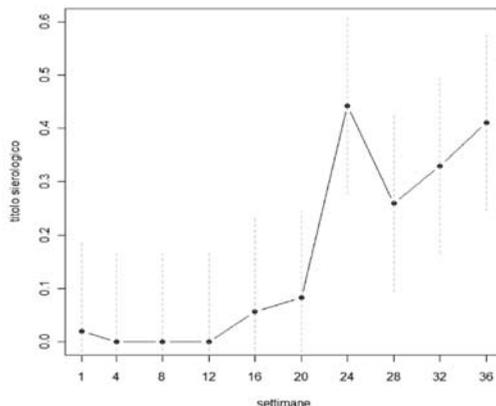
I risultati delle indagini ELISA espressi in termini di valori SP sono riportati nella Tabella 3 e Grafico 2

**TABELLA 3:** valori stimati del SP mediante modello a effetti misti con effetto random l'azienda

**TABLE 3:** SP estimated values using mixed effects model with random factor for farm

<i>Settimana</i>	<i>Valore medio SP</i>	<i>IC95%</i>
1	0,02	-0,145 – 0,185
4	0	-0,165 – 0,165
8	0	-0,165 – 0,165
12	0	-0,165 – 0,165
16	0,05618	-0,12 – 0,233
20	0,0825	-0,082 – 0,247
24	0,4425	0,278 – 0,607
28	0,25939	0,094 – 0,425
32	0,33	0,165 – 0,495
36	0,41	0,245 – 0,575

**GRAFICO 2:** andamento del valore SP per categoria  
**GRAPH 2:** SP performance in different category



**n PCR**

Nella tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti esaminando i tamponi nasali mediante n PCR mantenendo la suddivisione per azienda e per categorie di età degli animali. I risultati sono espressi come numero dei positivi e negativi con la relativa percentuale di prevalenza e intervallo di confidenza del 95%.

**TABELLA 4:** prevalenza d'infezione per azienda e categoria  
**TABLE 4:** herd and category infection prevalence

<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Prevalenza infezione%</i>	<i>IC95%</i>
1	1	0	5	0	0 - 52,18
1	4	0	5	0	0 - 52,18
1	8	0	5	0	0 - 52,18
1	12	0	5	0	0 - 52,18
1	20	1	4	20	0,51 - 71,64
1	24	1	4	20	0,51 - 71,64
1	28	1	4	20	0,51 - 71,64
1	32	1	4	20	0,51 - 71,64
1	36	1	4	20	0,51 - 71,64
2	1	0	5	0	0 - 52,18
2	4	0	5	0	0 - 52,18
2	8	0	5	0	0 - 52,18
2	12	0	5	0	0 - 52,18
2	16	1	4	20	0,51 - 71,64
2	20	1	4	20	0,51 - 71,64

<i>Azienda</i>	<i>Settimana</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>Prevalenza infezione%</i>	<i>IC95%</i>
2	24	2	3	40	5,27 - 85,34
2	28	1	4	20	0,51 - 71,64
2	32	1	4	20	0,51 - 71,64
2	36	1	4	20	0,51 - 71,64
3	1	0	5	0	0 - 52,18
3	4	0	5	0	0 - 52,18
3	8	0	5	0	0 - 52,18
3	12	1	4	20	0,51 - 71,64
3	16	1	4	20	0,51 - 71,64
3	20	1	4	20	0,51 - 71,64
3	24	1	4	20	0,51 - 71,64
3	28	1	4	20	0,51 - 71,64
3	32	1	4	20	0,51 - 71,64
3	36	1	4	20	0,51 - 71,64
4	1	0	5	0	0 - 52,18
4	4	0	5	0	0 - 52,18
4	8	0	5	0	0 - 52,18
4	12	1	4	20	0,51 - 71,64
4	16	2	3	40	5,27 - 85,34
4	20	1	4	20	0,51 - 71,64
4	24	2	3	40	5,27 - 85,34
4	28	1	4	20	0,51 - 71,64
4	32	1	4	20	0,51 - 71,64
4	36	1	4	20	0,51 - 71,64

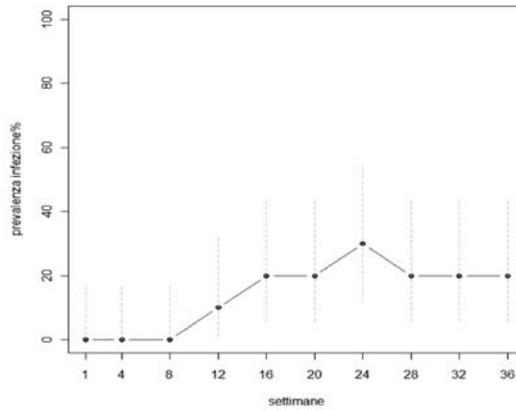
La prevalenza d'infezione per allevamento è riportata nella tabella 5. Nel Grafico 3 è riportata la prevalenza per categoria

**TABELLA 5** *prevalenza dell'infezione per azienda*

**TABLE 5** *herd infection prevalence*

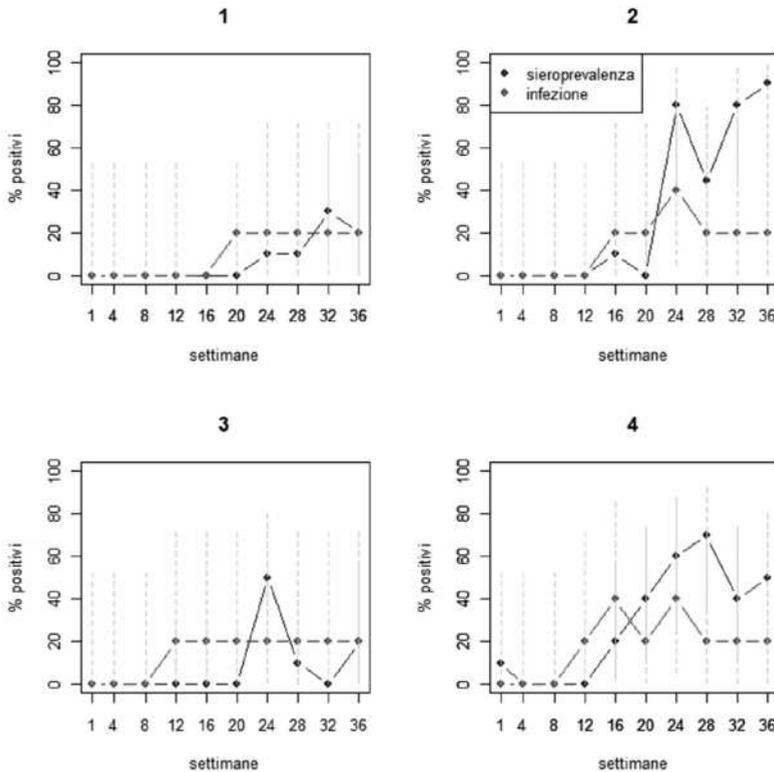
azienda	negativi	positivi	prev	low	up
1	45	5	10	3,33	21,81
2	43	7	14	5,82	26,74
3	43	7	14	5,82	26,74
4	41	9	18	8,58	31,44

**FIGURA 3:** *prevalenza infezione per categoria*  
**FIGURE 3:** *category infection prevalence*



Nel Grafico 4 sono riportati i risultati ottenuti per ciascuna azienda confrontando la siero prevalenza e l'infezione nelle diverse categorie di animali

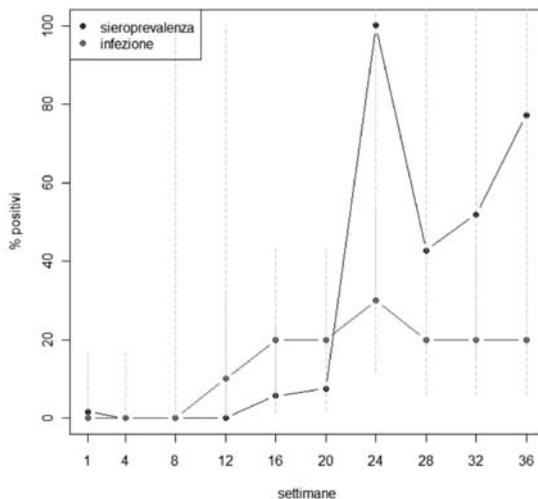
**FIGURA 4:** *confronto per ciascuna azienda fra l'infezione e la sieroprevalenza*  
**FIGURE 4:** *infection and seroprevalence in each farm*



Nel grafico 5, sono riportati la percentuale di positivi in n PCR e la siero prevalenza rispetto all'età degli animali appartenenti alle quattro aziende con i rispettivi intervalli di confidenza al 95%.

**FIGURA 5:** confronto fra sieroprevalenza e infezione per età degli animali.

**FIGURE 5:** comparison between seroprevalence and infection for age of animals



## DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica evidenziano come la siero conversione nelle 4 aziende sia rilevabile nelle categorie di età superiore alle 24 settimane. In tutti gli allevamenti la siero prevalenza è risultata nulla nelle categorie di età comprese tra la 4 e la 16. Gli anticorpi di origine materna sono stati rilevati solo nell'allevamento 4 e nella categoria dei suinetti della prima settimana di vita. Nell'azienda 4 la positività sierologica è comparsa più precocemente nel gruppo degli animali di 16 settimane di vita e la siero prevalenza si è mantenuta elevata oltre il 40% a partire dalla 20 settimana. Nell'azienda 2 è stato evidenziato un unico soggetto positivo nella categoria delle 16 settimane anche se la siero conversione è stata apprezzata nel gruppo delle 24 settimane.

I risultati della n PCR evidenziano nel loro insieme come l'infezione da *M.hyopneumoniae* presente nelle categorie di età superiore alle 20 settimane in tutte le aziende e in uno o due soggetti su cinque per categoria. La variabilità riguarda soprattutto l'inizio della circolazione che è stata dimostrata nel gruppo di suini di 12 settimane nell'azienda 3 e 4 e nei suini di 16 settimane nell'azienda 2. Se si considera la positività in tamponi nasali si può osservare che la prevalenza dell'infezione risulta superiore (2 soggetti su 5) nelle aziende 2 e 4 rispettivamente nelle categorie di 24 settimane nella prima azienda e di 16 e 24 settimane nella seconda.

La valutazione dei risultati delle indagini sierologiche e di n PCR per azienda consente di osservare che la circolazione più evidente e precoce avviene nell'allevamento 4. In questa azienda le n PCR cominciano ad essere positive nei suini di 12 settimane e dei 50 tamponi nasali esaminati 9 sono risultati positivi. Anche la siero conversione avviene nel gruppo di 16 settimane. Considerazione opposta può essere fatta per allevamento 1. Il 10% dei tamponi nasali è risultato positivo e il gruppo di suini di 20 settimane è risultato essere quello più precocemente infetto. La siero conversione è stata evidenziata nel gruppo di 24 settimane.

Nell'allevamento 3 nonostante le siero conversione evidenziata sempre a 24 settimane, la prevalenza di *M.hyopneumoniae* è risultata del 14 % e la circolazione precoce essendo stata evidenziata nel gruppo di 12 settimane. La positività dei tamponi nasali nel gruppo di 16 settimane suggerisce che nell'allevamento 2 la circolazione ha inizio precocemente ma è rimasta bassa fino alle 24 settimane dove aumenta per poi rimanere costante fino alle 36 settimane .

Tutti i 4 allevamenti hanno dimostrato una attiva circolazione dell'infezione da *M.hyopneumoniae* e con caratteristiche di diffusione diverse anche all'interno dei differenti gruppi di età . Questo aspetto difficilmente può essere evidenziato con l'utilizzo della sola sierologia soprattutto se applicata su un modello di campionamento cross sectional. L'utilizzo dell'esame sierologico in combinazione con n PCR può rappresentare un modello in grado di definire la diffusione dell'infezione nelle diverse realtà d'allevamento. L'applicazione in campo di questo protocollo deve tener conto che il prelievo in suini vivi deve essere di facile esecuzione, rapido, poco costoso e numericamente contenuto ma in grado di portare a dati utili per migliorare ed intensificare le misure di controllo in allevamento. L'utilizzo del tampone nasale rispetta tali criteri anche se è riconosciuto che il numero di microrganismi presente nelle cavità nasali è basso e che l'eliminazione avviene in maniera intermittente (Pietres e Pijoan 2006). Comunque l'utilizzo di n PCR in tamponi nasali per la diagnosi in vita di un'infezione naturale è riconosciuta valida in funzione del fatto che esiste una relazione tra la presenza di *M. hyopneumoniae* nelle cavità nasali e nei bronchi di polmoni con lesioni da polmonite enzootica.

(Sibilia et al., 2004). Tuttavia questa procedura è considerata più indicata per il monitoraggio dell'infezione in allevamento piuttosto che per valutare il singolo soggetto (Otagiri et al., 2005). L'applicazione di n PCR su lavaggio bronco alveolare o su tamponi bronchiali consentirebbe di determinare con maggior precisione il momento in cui un animale vivo è infetto (Marois et al., 2008) .

## CONCLUSIONE

Precedenti studi hanno dimostrato che la dinamica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* in allevamento sia difficilmente riconducibile ad un preciso modello ma sia spesso eterogenea e diversa a seconda della tipologia aziendale e della gestione dei gruppi di animali .

I risultati di questa indagine indicano che , pur avendo considerato 4 allevamenti della stessa tipologia e che non utilizzavano la vaccinazione da almeno 24 mesi, l'infezione di *M. hyopneumoniae* può avere una dinamica specifica e diversa a seconda delle caratteristiche delle aziende. La determinazione della dinamica in un allevamento richiede l'applicazione di protocolli diagnostici che comprendano oltre all'esame sierologico anche la n PCR su tamponi nasali di suini appartenenti a categorie ed età diverse. La conoscenza del momento, della fase di allevamento e della variabilità dell'infezione in gruppi dello stesso allevamento consente di affrontare il problema *M. hyopneumoniae* in maniera mirata e capire lo spazio temporale in cui gli animali si infettano al fine di stilare un corretto e puntuale protocollo vaccinale e/o di trattamenti antibiotici.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Artushin S, Stipkovits L, Minion FC. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Moll Cell Probes. 1993;7:381-385
- 2) Blanchard, B., Vena, M., Cavalier, A., Lannic, J., Gouranton, J., Kobisch, M., Le-Lannic, J., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30, 329-341
- 3) Calsamiglia; Pijoan C., Trigo A., 1999. Application of a nested PCR assay to detect *M. hyopneumoniae* from nasal swabs. Journal Veterinary Diagnostic Investigation 11: 246-251

- 4) Cipriani, A., T. A. Cruz, and M. De La Garza, 1994: *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. 25, 235–239
- 5) Erlandson, K. R., R. B. Evans, B. J. Thacker, M. W. Wegner, E. L. Thacker, 2005: Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Swine Health Prod. 13, 198–203
- 6) Fablet C., Marois C., Kobisch M., Madec F., Rose N. Estimation of sensitivity of four sampling methods for *M.hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. Veterinary Microbiology 2010. 238-245
- 7) Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarias, M. and Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs, Veterinary Journal, 184, 326-333
- 8) Grosse Beilage, E., Rohde, N. and Krieter, J., 2009. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, Preventive Veterinary Medicine, 88, 255-263
- 9) Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M. and Nielsen, O.L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark, Journal of Comparative Pathology, 143, 120–131
- 10) Kwon et al., 2002 D. Kwon, C. Choi and C. Chae, Chronologic localization of *M.hyopneumoniae* in experimentally infected pigs, *Veterinary Pathology* **39** (2002), pp. 584–587.
- 11) Ji, X.Q., Duan, Z.Q., Hua, Z.D. and Yu, D.B., 2009. Serological investigation and analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in miniature pigs, Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 9, 92–93 (in Chinese)
- 12) Maes et al., 2008 D. Maes, J. Segales, T. Meyns, M. Sibila, M. Pieters and F. Haesebrouck, Control of *M.hyopneumoniae* infections in pigs, Veterinary Microbiology 126 (2008), pp. 297–309
- 13) Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V., 2007. Isolation of *M.hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. Vet. Microbiol. 120, 96–104.
- 14) Mattson JG., Bergstrom K., Wallgren P., Johansson KE., 1995. Detection of *M. hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16 SrRNA gene. Journal Clinical Microbiology 33 893-897
- 15) Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F. and Maes, D., 2010. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter, Veterinary Journal, 2010 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 16) Opriessnig et al., 2004 T. Opriessnig, E.L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X.J. Meng and P.G. Halbur, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *M.hyopneumoniae* and porcine Circovirus type 2, Veterinary Pathology 41 (2004), pp. 624–640
- 17) Otagiri Y., Asai T., Okada M., Uto T., Yazaua S., Hirai H., Shibata I., Sato S., 2005. Detection of *M. hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. The Journal of Veterinary Medecine Science 67, 801-805
- 18) Pieters M., Pijoan C., 2006. Detection of *M. hyopneumoniae* e DNA in experimentally infected pigs. In Proceedings of the 19 International Pig Veterinary Society, Copenagen Denmark p. 209
- 19) R. F. Ross. 1999. *Mycoplasma*. In : Diseases of Swine 8 Edition. B. E. Straw, S. D’Allaire, W.L. Mengeling, D.J.Taylor, Eds., ISU Press,Ames,IA,pp.455-509

- 20) Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A. and Jensen, J.C., 2004. Dynamics of *M.hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems, Canadian Journal of Veterinary Research, 68, 12–18
- 21) Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segale' s, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *M.hyopneumoniae* infection. Vet. J. 181, 221–231
- 22) Sørensen, V., Jorsal, S.E., Mousing, J., 2006. Diseases of the respiratory tract. In: Leman, A.D., Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine, ninth ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 149–177
- 23) Thacher EL, Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Swine Health Prod. 2004; 12(5) : 252-254.
- 24) Thacker, E., 2006. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. 9th ed. Blacwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 701–71.

# ANALISI DELLA SENSIBILITA' DI CEPPI DI *Pasteurella multocida* E DI *Actinobacillus pleuropneumoniae* A TILMICOSINA: CONFRONTO TRA KIRBY-BAUER, MIC ED EFFICACIA IN CAMPO

## SENSIBILITY ANALYSIS OF *Pasteurella multocida* E DI *Actinobacillus pleuropneumoniae* STRAINS TO TILMICOSIN: COMPARISON BETWEEN KIRBY-BAUER, MIC METHODS AND FIELD EFFICACY

GUADAGNINI G.<sup>1</sup>, FERRO P.<sup>2</sup>, SALVINI F.<sup>1</sup>, ZANONI MG<sup>3</sup>, ALBORALI G.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>libero professionista PIGVET, Brescia;

<sup>2</sup>Elanco Animal Health, Sesto Forentino (FI);

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

**Parole chiave:** MIC, Kirby-Bauer, tilmicosina

**Keywords:** MIC, Kirby-Bauer, tilmicosina

**Riassunto.** *P.multocida* e *A.pleuropneumoniae* sono due patogeni rilevanti nel complesso della malattia respiratoria (PRDC). La sensibilità agli antibiotici viene normalmente valutata in vitro mediante la metodica Kirby-Bauer. L'isolamento di ceppi, soprattutto di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, risultati in vitro resistenti nei confronti di tilmicosina con discordanti effetti in campo ha indotto ad approfondire le indagini di laboratorio. A tal proposito sono stati selezionati 30 ceppi di *P.multocida* e 19 ceppi di *A.pleuropneumoniae* isolati in episodi di malattia respiratoria e testati per la valutazione della sensibilità in vitro verso tilmicosina utilizzando il test Kirby-Bauer e Minima Concentrazione Inibente. Tra questi ceppi sono stati inclusi ceppi isolati da focolai di malattia respiratoria che hanno mostrato resistenza in vitro con test Kirby-Bauer mentre l'utilizzo in campo è risultato efficace. Dal confronto dei risultati di laboratorio è emerso che la sensibilità evidenziata con il test kb è minore rispetto a quella osservata con MIC. Il 65,2 % dei ceppi di *P.multocida* sono risultati sensibili al primo test e il 96,6% alla MIC mentre per *A.pleuropneumoniae* è stata dimostrata una sensibilità del 10,5 % rispetto al 90 % evidenziata mediante MIC.

**Abstract.** *P.multocida* and *A.pleuropneumoniae* are relevant pathogens of porcine respiratory complex disease. The antibiotic susceptibility is tested using Kirby-Bauer method. The resistance to tilmicosin of some strains, specially for *A. pleuropneumoniae*, and the contemporary efficient treatment with tilmicosin in field showed the necessity to understand more about the laboratory research. 30 strains of *P.multocida* and 19 strains of *A.pleuropneumoniae* are tested for susceptibility to tilmicosin using Kirby-Bauer method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) method to compare results. In these strains we analyse some strains that shows resistance to antimicrobial susceptibility test using Kirby-Bauer method but collected from farms with respiratory disease where tilmicosin showed field efficacy when used in therapy. Susceptibility observed using Kirby Bauer test is lower than MIC. 65,2 % of *P.multocida* strains were susceptibilty using Kirby Bauer test and il 96,6% with MIC while about *A.pleuropneumoniae* 10,5 % were became 90 % with MIC.

### INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria suina è una sindrome multifattoriale sostenuta dall'azione contemporanea e sinergica di agenti infettivi che si esprime attraverso quadri clinici ed anatomo-patologici complessi, di difficile diagnosi e risoluzione.

*P.multocida* e *A.pleuropneumoniae* sono due dei principali agenti batterici in grado di causare polmonite nel suino.

*P.multocida* è un coccobacillo gram negativo, è anaerobio facoltativo ed in vitro cresce nella maggior parte dei terreni di arricchimento. Si conoscono 5 sierotipi capsulari, ma solamente tre sono di interesse suino. Le lesioni da *P.multocida* sono tipicamente polmonari: si rilevano aree di epatizzazione rossa che non si possono considerare patognomiche, poiché spesso agisce in sinergia con altri patogeni del complesso respiratorio suino (Pijoan, 2006)

*A.pleuropneumoniae* è l'agente della pleuropolmonite suina, è un gram negativo di piccole dimensioni, con forma bacillare o coccobacillare incapsulata. Generalmente la crescita in vitro necessita di sangue con aggiunta di NAD. Si conoscono 2 biotipi e in 15 sierotipi. Caratteristica del biotipo 1 è la crescita in vitro in forma satellitare a colonie di *Staphilococcus aureus* di cui aumenta la caratteristica parziale emolisi. Il biotipo 2 non necessita della presenza di NAD e di conseguenza si sviluppa indipendentemente dal zona satellite alle colonie di *Staphilococcus aureus*. *A.pleuropneumoniae* è produttore di citolisine APX I, APX II, APX III, APX IV essenziali per l'azione patogena e istolesiva. Per quanto riguarda le lesioni anatomiche patologiche, si rilevano aree di polmonite localizzata a livello dei lobi apicali e del lobo cardiaco, mentre nei lobi diaframmatici, la lesione è spesso focale e ben demarcata. Le aree di polmonite appaiono scure e solide, mentre la pleurite fibrinosa, molto evidente in animali in fase acuta, tende a ricoprire tutto il polmone e ad aderire completamente alla pleura parietale. (Gottschalk & Taylor, 2006)

In episodi di malattia respiratoria in presenza di *P.multocida* e *A.pleuropneumoniae* tilmicosina può essere considerata uno degli antimicrobici da utilizzare per la terapia orale. La sua efficacia è dimostrata in vitro (Paradis MA et al 2002) ed in vivo (Mortimer et al 2002).

Negli ultimi anni sono stati segnalati ripetutamente episodi di malattia respiratoria che hanno coinvolto questi due patogeni in cui tilmicosina a fronte di una resistenza osservata in laboratorio al test Kirby Bauer si è dimostrata efficace in campo. I ceppi isolati in focolai di malattia respiratoria con questa caratteristica sono stati conservati per approfondimenti in merito alla loro particolare sensibilità in vitro.

Questa situazione ripetuta nel tempo ha suggerito di analizzare contemporaneamente i ceppi di *P.multocida* e di *A.pleuropneumoniae* isolati in questi episodi sia mediante la tecnica Kirby-Bauer, sia stabilendo la Minima Concentrazione Inibente (MIC) mediante diluizioni scalari in terreno liquido.

## **MATERIALI E METODI**

*P.multocida* è stata isolata su terreno agar sangue semplice mentre l'*A.pleuropneumoniae* in terreno agar sangue addizionato con NAD.

La sensibilità alla tilmicosina è stata valutata mediante la tecnica Kirby Bauer e MIC allestendo contemporaneamente le indagini di laboratorio per tutti i ceppi dei due patogeni conservati.

L'apposizione di un dischetto imbibito di antibiotico su una piastra inoculata con coltura batterica pura.

Per l'esecuzione dell'antibiogramma con metodica Kirby Bauer sono stati utilizzati terreni Mueller- Hinton agarizzati per la *P.multocida* mentre per l'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. è risultato necessario l'utilizzo di terreno arricchito denominato "Chocolate Mueller-Hinton agar".

Per eseguire il test di suscettibilità è necessaria la preparazione dell'inoculo, ottenuto mediante una sospensione batterica in brodo. Sono state prelevate colonie da una piastra in coltura pura del ceppo batterico da testare, precedentemente incubata per 24 ore, in modo da ottenere una torbidità standard di 0,5 McFarland. Entro 15 minuti dalla preparazione dell'inoculo, questo

è stato distribuito sul terreno solido, dopo essere stato adeguatamente mescolato in modo da evitare che parte della sospensione batterica possa restare attaccata alle pareti della provetta. Il terreno solido è stato totalmente ricoperto dalla sospensione batterica mediante l'utilizzo di un tampone ripetendo l'operazione 2-3 volte e contemporaneamente ruotando la piastra di 60° al fine di garantire una totale copertura del terreno. La piastra contenente il terreno inoculato è stata quindi coperta e lasciata 3-5 minuti a riposo; ogni eccesso di inoculo è stato asciugato prima di essere riposto il dischetto contenente antibiotico. Successivamente è stato posto sul terreno inoculato il dischetto contenente tilmicosina, assicurandosi che appoggiasse con tutta la superficie sul terreno.

In seguito le piastre sono state incubate in apposito termostato: *P.multocida* è stata incubata in termostato in aerobiosi a 35° C per 24 ore, mentre l'*A.pleuropneumoniae* è stato incubato in termostato con il 6% di CO<sub>2</sub>. Il giorno seguente sono stati misurati manualmente gli aloni di inibizione attribuendo il carattere di sensibile/intermedio/resistente al ceppo testato.

Per quanto riguarda la prova di sensibilità eseguita mediante microdiluizioni scalari in terreno liquido al fine di stabilire la concentrazione minima inibente è stata necessaria la preparazione della soluzione antibiotata e del terreno culturale.

La soluzione madre di antibiotico è stata preparata a partire da polvere di Tilmicosina con peso e standard di attività noti.

Per il calcolo del volume è necessario considerare la seguente formula:

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potenza (\mu\text{g}/\text{mg})}}{\text{Concentrazione(\mu\text{g}/\text{ml})}}$$

Il solvente utilizzato è stato il glicole, la quantità minima di solvente è stata introdotta per stabilizzare la polvere antibiotica e quindi in seguito è stato aggiunto per arrivare alla concentrazione desiderata.

La soluzione madre è stata preparata ad una concentrazione di 2560 μg/ml utilizzando una cappa filtrante in modo da non contaminare la soluzione che è stata stoccata in criotube ad una temperatura di -80°C.

Al momento dell'analisi la soluzione madre di antibiotico è stata diluita 1:10 utilizzando Mueller-Hinton broth, raggiungendo una concentrazione di 256 μg/ml. Il brodo utilizzato per la crescita della *P.multocida* è stato il Mueller-Hinton Broth, il quale viene preparato sfruttando Mueller-Hinton liofilizzato (21g/l) al quale viene aggiunta acqua distillata. Il ph era compreso tra 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente (25°C) e dopo la preparazione il brodo è stato autoclavato e fatto riposare una notte a 4°C. Su ogni campione di terreno è stato eseguito il controllo di sterilità.

Per quanto riguarda *A.pleuropneumoniae* è stato utilizzato il VFM, Veterinary Fastidious Medium, che utilizza come base il Mueller-Hinton Broth al quale sono stati addizionati alcuni componenti necessari per la crescita del batterio. E' stato utilizzato il supplemento C BD Diagnostic costituito da un concentrato di lieviti. Ottenuti il brodo di coltura che differisce in base al batterio da testare e la soluzione madre di antibiotico, è stato necessario preparare l'inoculo batterico per poter eseguire il test antibiotico mediante microdiluizioni. E' stato necessario selezionare da 3 a 5 colonie con medesima morfologia dalla coltura pura e trasferire la patina in una provetta contenente 5 ml di brodo (MHB), incubare pochi minuti al fine di ottenere una torbidità simile al 0,5 Mc Farland. La soluzione con tale torbidità' contiene circa 1 o 2 × 10<sup>8</sup> cfu/ml . Inoltre è stato utilizzare uno spettrofotometro per controllare la densità dell'inoculo. La soluzione è stata diluita in modo da ottenere una concentrazione finale in piastra di 5 × 10<sup>5</sup> cfu/ml. L'inoculo è stato periodicamente controllato per determinare le unità formanti colonia (cfu).

Le diluizioni di antibiotico da testare sono state ottenute secondo il log in base 2 utilizzano

delle piastre microtitre 96 pozzetti. Su ogni piastra sono stati testati 4 ceppi batterici della stessa specie nei confronti di un unico antibiotico in diluizioni scalari. Nella tabella 1 è riportato lo schema della piastra utilizzata e la disposizione delle diluizioni di antibiotico.

**Tabella 1** *Diluizioni scalari di antibiotico schema piastra utilizzato per la lettura della mic*  
**Table 1** *Antibiotic gradual dilution in microtitre plate and scheme of the plate used for MIC analysis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
1	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
2	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
2	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
3	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
3	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
4	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C
4	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	C	C

La piastra inoculata è stata incubata per 24 ore alla temperatura di 37° C. Il giorno seguente, prima di procedere alla lettura, è stata valutata la crescita nel controllo della carica batterica inoculata e solo se conforme si è proceduto con la lettura della MIC.

La Minima Concentrazione Inibente è stata considerata la concentrazione minima dell'antibiotico in grado di inibire la crescita del ceppo batterico e corrisponde alla quantità di antibiotico contenuto nell'ultimo pozzetto dove non si osserva torbidità o precipitato batterico.

La torbidità o il precipitato batterico dovevano essere presenti nel pozzetto 11 che rappresenta il controllo della crescita batterica, mentre il pozzetto 12 doveva risultare limpido in quanto controllo del terreno di coltura. (Anonimous, 2002)

Per la lettura dell'antibiogramma eseguito mediante la metodica Kirby-Bauer, è stato considerato un diametro minimo dell'alone di inibizione di 11 mm per giudicare un ceppo sensibile alla Tilmicosina.

Per quanto riguarda la microdiluizione scalare al fine di determinare la MIC, un ceppo è stato considerato sensibile alla Tilmicosina con una MIC minore o uguale a 16, mentre una MIC di 32 è stata assegnata la resistenza al ceppo testato.

## RISULTATI

### *Pasteurella multocida*

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati del test Kirby Bauer e MIC eseguiti per i ceppi di *P.multocida* .

CEPPI	KIRBY-BAUER	MIC
1	S	4 µg/ml
2	R	4 µg/ml
3	S	0,5 µg/ml
4	R	1 µg/ml
5	S	4 µg/ml
6	S	2 µg/ml
7	S	4 µg/ml
8	S	1 µg/ml
9	S	0,5 µg/ml
10	S	4 µg/ml
11	R	8 µg/ml
12	S	2 µg/ml
13	S	64 µg/ml
14	R	8 µg/wml
15	R	4 µg/ml
16	R	2 µg/ml
17	R	4 µg/ml
18	S	4 µg/ml
19	S	1 µg/ml
20	S	0,5 µg/ml
21	R	1 µg/ml
22	R	1 µg/ml
23	S	1 µg/ml
24	S	4 µg/ml
25	R	2 µg/ml
26	R	4 µg/ml
27	R	4 µg/ml
28	R	4 µg/ml
29	S	1 µg/ml
30	S	0,5 µg/ml

**Tabella 2** Risultati dei test di sensibilità dei ceppi di *P.multocida* eseguiti mediante tecnica Kirby-Bauer e MIC

**Tabella 2** Susceptibility of *P. Multocida* strains using Kirby-Bauer and MIC methods

Dei 29 ceppi di *P.multocida* testati con la metodica Kirby-Bauer 17 risultano sensibili alla Tilmicosina pari al 65,2 % . Esaminando i risultati ottenuti mediante l'utilizzo della microdiluzione scalare, 29 dei 30 ceppi testati mostrano una MIC inferiore a 8 µg/ml, 1 ceppo ha una MIC pari a 64 µg/ml . Pertanto il 96,6% dei ceppi testati risulta essere sensibile alla Tilmicosina . Nella Tabella 3 sono riportati i numeri dei ceppi sensibili in funzione della MIC ottenuta

CONCENTRAZIONE	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml
N° CEPPI	2	12	4	7	4
PERCENTUALE %	6,9	41,4	13,8	24,1	13,8

**Tabella 3** MIC dei 29 ceppi *M. multocida* sensibili

**Table 3** MIC of *P. multocida* strains susceptible

### *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati del test Kirby Bauer e MIC eseguiti per i ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae*

CEPPO	BIOTIPO	SIEROTIPO	KIRBY-BAUER	MIC
1	APP1	9a	R	2 µg/ml
2*	APP1	9a	R	4 µg/ml
3	APP1	9	R	2 µg/ml
4	APP1	7	R	2 µg/ml
5	APP1	9a	R	4 µg/ml
6	APP1	5	R	2 µg/ml
7	APP1	9a	R	>64 µg/ml
8	APP1	9a	R	2 µg/ml
9	APP1	9a	R	2 µg/ml
10	APPP1	2	R	2 µg/ml
11	APP1	2	R	2 µg/ml
12	APP2	9	S	2 µg/ml
13	APP1	9a	R	4 µg/ml
14	APP2	2	R	4 µg/ml
15	APP1	9	R	4 µg/ml
16*	APP1	2	R	>64 µg/ml
17	APP2	7	S	1 µg/ml
18	APP1	2	R	4 µg/ml
19	APP1	7	R	2 µg/ml

**Tabella 4** Risultati dei test di sensibilità dei ceppi di *A.pleuropneumoniae* eseguiti mediante tecnica Kirby-Bauer e MIC

**Table 4** Susceptibility of *A.pleuropneumoniae* strains using Kirby-Bauer and MIC methods

2 dei 19 (10,5 %) ceppi di *A.pleuropneumoniae* testati mediante la metodica Kirby-Bauer sono risultati sensibili alla tilmicosina pari al. I risultati ottenuti mediante l'utilizzo della MIC indicano come 17 ceppi testati pari all'89,5 % sono da considerare sensibili. Nella Tabella 5 sono riportati i numeri dei ceppi di *A.pleuropneumoniae* sensibili in funzione della MIC ottenuta

CONCENTRAZIONE	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
N° CEPPI	6	10	1
PERCENTUALE %	35,3	58,8	5,9

**Tabella 5** MIC dei 17 ceppi di *A.pleuropneumoniae* sensibili  
**Table 5** MIC of *A.pleuropneumoniae* strains susceptible

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La valutazione della sensibilità in vitro dei ceppi di *P.multocida* e *A pleuropneumoniae* isolati in episodi di malattia respiratoria viene eseguita normalmente mediante test Kirby Bauer considerando i principali antimicrobici utilizzati nei programmi terapeutici. Vi sono situazioni in cui può risultare utile approfondire ulteriormente in campo ed in laboratorio tali risultati. La ripetuta segnalazione di un'efficacia di tilmicosina in allevamento in episodi in cui erano stati isolati ceppi risultati resistenti in vitro ha indotto a considerare la determinazione della MIC mediante metodi di diluizione e il monitoraggio periodico delle sensibilità di questi ceppi. Il confronto delle due metodiche Kirby Bauer e MIC indica che per *P.multocida*, nella maggior parte dei ceppi (15/29) vi è il medesimo risultato. Tuttavia in un certo numero di ceppi (13) si rileva discordanza tra le due metodiche con netta prevalenza della categoria di ceppi resistenti a Kirby Bauer e con MIC sensibili.

Per quanto riguarda i ceppi di *A.pleuropneumoniae* si rileva una discordanza superiore tra le due tecniche.

15 ceppi risultati resistenti con tecnica Kirby-Bauer hanno evidenziato una MIC molto bassa confermando il risultato ottenuto in campo con il trattamento. In queste situazioni è importante seguire un protocollo per verificare l'efficacia della tilmicosina nel tempo affiancando alla metodica Kirby-Bauer la MIC e il costante raffronto con l'efficacia in campo. Inoltre è indispensabile approfondire la reale situazione di campo procedendo a testare più ceppi aziendali mediante MIC ed in caso di sensibilità controllare nel tempo l'efficacia di tilmicosina in allevamento. In ogni caso, la determinazione della MIC mediante metodi di diluizione e il monitoraggio periodico delle sensibilità di questi ceppi sono le basi tecniche per giustificare e mantenere un tale programma terapeutico aziendale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pijoan C. (2006) "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing, chapter 43
2. Gottschalk M. & Taylor D.J. (2006) "Diseases of swine" 9th edition, Ames, Iowa Usa, Blackwell Publishing, chapter 33
3. Paradis M.A., Higgins R., Larivière S., De Lasalle F., Wilson J., Dick P. (2002) "In-vitro antimicrobial activity of tilmicosin against field swine pathogens" Proceedings of the 17th IPVS Congress, 2002, Ames, Iowa, USA, paper 216
4. Mortimer I., Kongsted K. (2002) "Elimination of APP and mycoplasma from a 360 sow danish pig farm" Proceedings of the 17th IPVS Congress, 2002, Ames, Iowa, USA, paper 401
5. Anonimous (2002) "M31-A2 Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard – 2nd edition" NCCLS Vol 22 n°6

## GRIGLIA SPES: AGGIORNAMENTO SUL MONITORAGGIO DELLE LESIONI PLEURICHE IN SUINI MACELLATI.

### **UPDATE ON THE MONITORING OF PLEURAL LESIONS AT SLAUGHTERHOUSE USING THE SPES GRID IN ITALIAN SLAUGHTERED PIGS**

LUPPI A., BONILAURI P., MERIALDI G., DOTTORI M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)*

**Parole chiave:** malattia respiratoria, macello, lesioni pleuriche

**Key words:** respiratory disease, slaughterhouse, pleurisy

**Riassunto.** Tra febbraio 2008 e gennaio 2011 sono state sottoposte a score polmonare con il metodo di valutazione delle pleuriti al macello denominato “*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*” (SPES), 14195 suini appartenenti a 139 partite provenienti da allevamenti ubicati nel nord Italia. La griglia SPES prevede l’assegnazione di un punteggio, da un minimo di 0 ad un massimo di 4, a seconda della localizzazione e dell’estensione delle lesioni pleuriche e fornisce due risultati: il valore medio SPES che descrive il grado generale di pleurite della partita e l’indice APPI (*Actinobacillus pleuropneumoniae* index) che fornisce informazioni sulla prevalenza e gravità delle pleuriti dorso-caudali (grado 2, 3 e 4) che risultano essere fortemente correlate a precedenti infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) (Dottori et al., 2007; Merialdi et al., 2008). Il 42% dei polmoni esaminati ha evidenziato lesioni riferibili a pleurite cronica (SPES score  $\geq 1$ ). Pleuriti dorso-caudali (SPES score  $\geq 2$ ) sono state rilevate nel 24.2% dei casi, di cui con lesioni di grado 2, 3 e 4 rispettivamente nel 14.3%, nell’8.3% e nell’1.6% dei polmoni esaminati. Il punteggio medio ottenuto con la griglia SPES, considerando tutte le partite analizzate, è stato pari a 0.41, mentre il punteggio medio dell’indice APPI è risultato pari a 0.60. La distribuzione dei punteggi APPI è stata convenientemente suddivisa in 4 quartili che rappresentano le partite punteggiate: valore APPI <0.28 (quarto migliore delle aziende campionate); valori APPI tra 0.28 e 0.53 (quarto intermedio migliore delle aziende campionate); valori APPI tra 0.53 e 0.81 (quarto intermedio peggiore delle aziende campionate); valore APPI >0.81 (quarto peggiore delle aziende campionate). Questa distribuzione ha permesso di costituire quattro classi all’interno delle quali posizionare una determinata partita sulla base dell’indice APPI ottenuto e di classificarla rispetto ad una popolazione di suini rappresentativa come quella oggetto dello studio.

**Summary .** From February 2008 to January 2011, lungs from 14195 pigs belonging to 139 batches, coming from northern Italian farms, were evaluated using the Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System (SPES). Using the SPES grid, a score ranging from 0 to 4 is assigned depending on the extension and location of pleural adhesences. Two outputs for each batch are provided: the SPES average value and the App Index (APPI) giving information on the prevalence and the severity of dorso-caudal pleuritis (scores 2, 3 and 4) highly suggestive of pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) (Dottori et al., 2007; Merialdi et al., 2008). 42.0% of the lungs showed chronic pleuritis (SPES score  $\geq 1$ ). Dorso-caudal pleuritis (SPES score  $\geq 2$ ) was found in 24.2% of the lungs. Lesions with score 2 were assessed in 14.3% and lesions scoring 3 and 4 were present in 8.3% and 1.6% of pigs, respectively. The mean SPES value of the overall lungs was 0.41. The mean APPI of all batches

was 0.60. The APPI values were organized in four classes: best quarter < 0.28; intermediate best quarter from 0.28 to 0.53; intermediate worst quarter from 0.53 to 0.81 and worst quarter > 0.81. This study confirms the high prevalence of dorso-caudal pleuritis in Italy, approximately twice when compared to the data obtained in Spain by Fraile et al. (2009) using the same scoring system. The distribution in classes of APPI values obtained from lungs belonging to 14195 pigs can be used as a tool for ranking a batch in respect of the general population.

## INTRODUZIONE

La malattia respiratoria è considerata il problema sanitario di maggior impatto economico nella moderna produzione suinicola, ed il rischio si è accresciuto di pari passo con l'intensificarsi delle produzioni (Sørensen et al., 2006).

Il macello costituisce la sede dove poter eseguire valutazioni di tipo sanitario sugli animali macellati. In questa sede infatti è possibile raccogliere importanti informazioni che sono il risultato dell'interazione tra l'animale, l'ambiente e gli agenti patogeni durante l'intero ciclo produttivo.

In questo contesto il monitoraggio delle lesioni polmonari al macello è riconosciuto come efficace strumento per la stima di prevalenza e gravità della patologia respiratoria, soprattutto per quanto riguarda la valutazione dell'incidenza di Polmonite Enzootica (PE) nonché delle lesioni pleuriche. Queste ultime, soprattutto sotto forma di Pleuriti Croniche (PC) costituiscono un riscontro comune in sede di macellazione (Cleveland-Nielsen et al., 2002; Fraile et al., 2009) a livello di lobi ventro-craniali e dorso-caudali.

Le lesioni pleuriche a localizzazione dorso-caudale risultano essere fortemente suggestive di una precedente infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). Il rilevamento delle lesioni pleuriche in sede di macellazione viene correlato con minori performance e significativo allungamento dei tempi d'accrescimento (Mousing et al., 1990) del suino. Infatti App è da considerare 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).

Numerosi metodi sono stati proposti per il rilievo e la valutazione delle lesioni pleuriche al macello tra cui si citano la griglia anglosassone Pointon et al. e quella danese di Christensen et al. entrambe del 1999 (Cleveland-Nielsen et al., 2002). In questo contesto il sistema di valutazione al macello delle pleuriti (Dottori et al., 2007) denominato "*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*" (SPES) da cui origina la griglia omonima, rappresenta un metodo rapido, economico, sensibile e specifico per la valutazione delle lesioni pleuriche al macello, riferibili a precedenti infezioni da App.

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. Aggiornare ed integrare i dati ottenuti dall'applicazione della griglia SPES nel quadriennio 2008-2011.
2. Fornire informazioni ed elementi utili alla corretta interpretazione dei risultati ottenuti dall'applicazione della griglia SPES.

## MATERIALI E METODI

Tra febbraio 2008 e gennaio 2011 sono state sottoposte a score polmonare con il metodo SPES 139 partite di suini provenienti da allevamenti presenti nel nord Italia, fra le quali sono state incluse anche 48 partite analizzate nell'ambito di un progetto europeo di valutazione della prevalenza di lesioni pleuriche al macello i cui risultati sono stati precedentemente presentati (Dottori et al., 2008; Meriardi et al., 2008).

Gli allevamenti da cui provengono le partite sopraccitate sono situati in Pianura Padana e finalizzati alla produzione del suino pesante (peso di macellazione 160 kg). Da ogni allevamento è stata presa in considerazione e monitorata al macello una partita di suini e sono stati valutati mediamente i polmoni appartenenti a 100 animali/partita (10), per un totale di 14195 suini.

Alla catena di macellazione le lesioni riferibili a PC sono state sottoposte a valutazione utilizzando il metodo di valutazione al macello delle pleuriti recentemente implementato (10) e denominato “*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*” (SPES).

La Tabella 1 illustra i principi di valutazione su cui si basa la griglia SPES con evidenziato il punteggio assegnato in relazione alla tipologia della lesione.

**Tabella 1:** griglia SPES per la valutazione delle Pleuriti Croniche

**Table 1.** The SPES grid for Chronic Pleuritis scoring.

Punteggio	Caratteristiche della lesione
0	Assenza di lesioni da PC
1	Lesioni antero-ventrali: aderenze pleuriche tra lobi o ai bordi ventrali dei lobi
2	Lesioni focali dorso-caudali monolaterali
3	Lesioni bilaterali di tipo 2 o lesioni monolaterali estese (almeno 1/3 di un lobo diaframmatico)
4	Gravi lesioni bilaterali estese (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici)

La griglia SPES fornisce due risultati: il valore medio SPES (somma dei singoli score pleurici/numero di polmoni valutati) che descrive il grado generale di pleurite della partita e l'indice APPI (*Actinobacillus pleuropneumoniae* index) che fornisce informazioni sulla prevalenza e gravità delle pleuriti dorso-caudali che come accennato in precedenza risultano essere fortemente correlate a precedenti infezioni da App. L'indice APPI viene calcolato applicando la formula seguente: *frequenza delle lesioni dorso-caudali (con punteggio 2, 3 e 4) moltiplicato per la media calcolata considerando soltanto i polmoni con lesioni dorso-caudali (con punteggio 2, 3 e 4).*

$$\text{Media SPES} = \sum_{j=1}^n x_j / n$$

Dove  $x$  è lo score di ogni singolo polmone e  $n$  è il numero di polmoni punteggiati nella partita

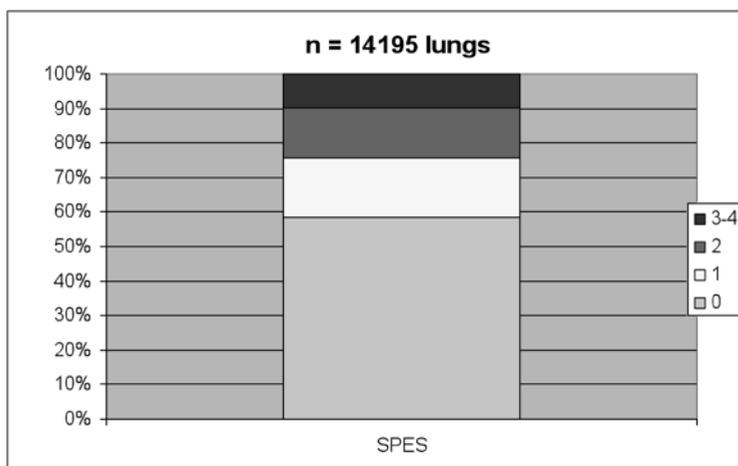
$$\text{Indice APPI} = \left[ \left( \sum_{i=1}^{pd} y_i / pd \right) * (pd / n) \right] = \sum_{i=1}^{pd} y_i / n$$

Dove  $y$  è lo score di ogni polmone affetto da pleuriti dorso caudali (score 2, 3 o 4),  $pd$  è il numero di polmoni affetto da pleuriti dorso caudali e  $n$  è il numero di polmoni punteggiati nella partita. Un metodo equivalente per il calcolo dell'APPI è quello di ottenere la media dei polmoni punteggiati considerando soltanto quelli con lesioni a localizzazione dorso caudale (score 2, 3 o 4), cioè considerando tutti i polmoni punteggiati con score uguale a 1, come polmoni non affetti da pleuriti.

## RISULTATI

L'applicazione della griglia SPES sui polmoni di 14195 suini macellati ha evidenziato la presenza di lesioni pleuriche (punteggi 1, 2, 3 o 4) nel 42% dei casi. All'interno di questa

percentuale i polmoni affetti da pleurite dorso caudale (punteggi 2, 3 o 4) e riconducibili ad evoluzione cronica di pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* sono la maggioranza e precisamente il 58.3%. Lesioni pleuriche a localizzazione dorso caudale (punteggi 2, 3 o 4) sono state riscontrate nel 24.2% dei 14195 animali inclusi nello studio. In dettaglio, lesioni a Punteggio SPES = 2 costituivano il 14,3% dei casi, mentre lesioni a Punteggio SPES = 3 e 4 erano presenti rispettivamente nel 8,3% e 1,6% dei suini (Grafico 1). Il punteggio medio ottenuto con la griglia SPES, considerando tutte le partite analizzate, è stato pari a 0.41, con deviazione standard di 0.39. Il punteggio medio dell'indice APPI ottenuto dalle 139 partite punteggiate in questo studio, come se fossero una sola partita di macellazione, è risultato pari a 0.60. La distribuzione dei punteggi APPI può essere convenientemente suddivisa in 4 quartili che rappresentano le partite punteggiate relativamente alla frequenza e gravità di lesioni pleuriche dorso-caudali come riportato in figura 1 e 2. E' interessante notare come le partite di suini appartenenti alla frazione di aziende che ricade nel quanto migliore, cioè con APPI inferiore a 0.28, abbiano presentato tutte una frequenza di polmoni con lesioni a localizzazione dorso caudale inferiore al 13%. Le partite che si sono localizzate nel quarto peggiore, cioè con APPI maggiore di 0.81, hanno presentato tutte una frequenza di polmoni con lesioni a localizzazione dorso caudale superiore al 30%.



**Figura 1.** Distribuzione dei punteggi pleurici (griglia SPES) tra gli 14195 polmoni osservati al macello.

**Figure 1.** Distribution of pleurisy scoring (SPES grid) from 14195 checked lungs.



**Figura 2:** Distribuzione dei punteggi APPI in quattro quartili: valore APPI <0.28 (quarto migliore delle aziende campionate); valori APPI tra 0.28 e 0.53 (quarto intermedio migliore delle aziende campionate); valori APPI tra 0.53 e 0.81 (quarto intermedio peggiore delle aziende campionate); valore APPI>0.81 (quarto peggiore delle aziende campionate)

**Figure 2:** Distribution of APPI values in four classes: APPI < 0.28 (best quarter); APPI from 0.28 to 0.53 (intermediate best quarter); APPI from 0.53 to 0.81 (intermediate worst quarter); APPI > 0.81 (worst quarter).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio forniscono una panoramica altamente significativa sull'impatto della patologia respiratoria sostenuta da App in Italia.

I dati ottenuti, che indicano la presenza di pleuriti di grado 2, 3 e 4 nel 24.2% dei polmoni esaminati, fortemente indicative di precedenti infezioni da App, sono in accordo con segnalazioni di altri autori in Francia, Danimarca e Belgio (Christensen, 1998; Maes et al., 2001; Cleveland-Nielsen et al., 2002; Pagot et al., 2007; Maes, 2008; Maes et al., 2008; Marois et al., 2008;) e confermano l'importante incidenza delle pleuriti nella nostra realtà produttiva. Tuttavia, i risultati ottenuti in questo studio evidenziano come la proporzione di suini presentanti pleuriti dorso-caudali croniche all'età di macellazione sia estremamente elevata, all'incirca il doppio di quella riscontrata da Fraile et al. (2009) in Spagna applicando lo stesso sistema di rilevazione e valutazione delle lesioni pleuriche al macello.

Il metodo SPES come accennato, si completa con la valutazione statistica dei risultati ottenuti dal monitoraggio eseguito al macello e con la produzione di un report che per ogni partita è in grado di fornire due parametri: il valore medio SPES e l'indice App. Il valore medio SPES di 0.41 ottenuto in questo studio, calcolato considerando sia le pleuriti cranio-ventrali sia quelle dorso-caudali, può essere considerato come soglia di riferimento al di sopra o al di sotto della quale può posizionarsi il dato ottenuto da una determinata partita che viene sottoposta a valutazione al macello. Tuttavia, come già accennato, il valore medio SPES descrive lo stato generale della partita senza fornire una chiara indicazione sulla prevalenza e gravità delle pleuriti croniche dorso-caudali. Queste ultime informazioni sono invece contenute nell'indice App che nel presente studio, calcolato sulla totalità dei polmoni esaminati come facenti parte di un'unica partita, è risultato essere di 0.60. Ancor più importante è la possibilità, attraverso l'analisi della distribuzione dei punteggi APPI ottenuti sulla popolazione oggetto dello studio, di eseguire una suddivisione delle partite in 4 quartili, relativamente alla frequenza ed alla gravità delle lesioni. Questo ha permesso di costituire quattro classi che possono essere impiegate per classificare una determinata partita sulla base del proprio indice APPI, rispetto ad una popolazione di suini rappresentativa di una determinata area geografica, come quella oggetto dello studio. In questo modo sarà possibile posizionare una partita sottoposta a monitoraggio al macello, nel quarto migliore, intermedio migliore, intermedio peggiore o nel quarto peggiore delle partite campionate dal 2008 ad oggi.

Nel presente lavoro il metodo SPES conferma la sua affidabilità ed efficacia nella valutazione delle lesioni pleuriche al macello evidenziando l'elevata prevalenza, nei suini allevati nel nord Italia, delle pleuriti croniche dorso-caudali riferibili a precedenti infezioni da App. La produzione di parametri ottenuti dall'analisi statistica dei risultati del monitoraggio delle lesioni pleuriche al macello segna un punto cruciale per una corretta comprensione e collocazione del problema pleuriti da App negli allevamenti italiani. Infine dall'analisi delle distribuzioni delle singole partite all'interno dei quartili individuati, è possibile asserire che le partite in cui la frequenza di polmoni affetti da lesioni dorso caudali è inferiore al 13% ricadono sempre nel quarto migliore della distribuzione e quelle per le quali questa frequenza è maggiore del 30% ricadono sempre nel quarto peggiore. Quindi 13% e 30% possono essere considerati due semplici cut-off, per una valutazione preliminare delle partite già in sede di macellazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Christensen N, (1998), "A unified scoring system for pleurisy in slaughter pigs" 15<sup>o</sup> IPVS, 255
2. Cleveland-Nielsen A, Nielsen E, Ersboll A, (2002) "Chronic pleuritis in Danish slaughter pigs", *Prev. Vet Med*, 30; 55 (2):121-135
3. Dottori M., Bonilauri P., Merialdi G., Nigrelli A., Martelli P., 2008. Monitoring chronic pleuritis due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* at the slaughterhouse by a newly implemented scoring system. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, Volume 2: p 230.
4. Dottori M., Nigrelli A.D., Bonilauri P., Merialdi G., Gozio S., Cominotti F., 2007. SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). Proposta per un nuovo approccio ispettivo delle lesioni polmonari in sede di macellazione. Atti del XXXIII convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Modena (MO) 29-30 Marzo 2007, 141-148.
5. Fraile L., Alegre A., López-Jiménez R., Nofrarias M., Segalés J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter pigs. *The Veterinary Journal*, 184(3):326-33.
6. Hartley P, Wilesmith J, Bradley R, (1988), "The influence of pleural lesions in the pig at slaughter on the duration of the fattening period: an on-farm study" *The Vet Rec*, 123: 208
7. Losinger W.C. (2005). Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 68:181-193.
8. Maes D, Chiers K, Haesenbrouck F, Laevens H, Verdonck M, de Kruif A, (2001) 2 Herd factors associated with the seroprevalence of App serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds" *Vet Res*, 32 (5): 409-419
9. Maes, D., 2008. Risk factors for pleuritis in slaughter pigs from different European countries. In: 20th International Pig Veterinary Congress, Durban, South Africa, Intervet Satellite Symposium.
10. Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126, 297–309.
11. Marois, C., Cariolet, R., Morvan, H., Kobisch, M., 2008. Transmission of pathogenic respiratory bacteria to specific pathogen free pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology* 129, 325–332.
12. Merialdi G., Bonilauri P., Dottori M., Nigrelli A., Martelli P., 2008. Monitoring respiratory disease at slaughterhouse at the slaughterhouse using lung and pleural lesions score and serology. Proceedings of the 20<sup>th</sup> IPVS Congress, Durban, South Africa, June 22-27, 2008; vol. 2: p. 380.
13. Mousing J, Lybye H, Barfod K, Meyling A, Ronsholt L, e Willeberg P, (1990) "Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factor", *Prev Vet Med* 9: 107-119
14. Pagot, E., Pommier, P., Keita, A., 2007. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. *Revue Médecine Vétérinaire* 158, 253–259.
15. Sørensen V. et al (2006) "Disease of the respiratory system" in: *Diseases of Swine*, 9<sup>th</sup> ed., 149-177.

# BRONCOPOLMONITE VERMINOSA FATALE DA *METASTRONGYLUS ELONGATUS* IN UN SUINO CO-INFETTATO DA CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2

## *FATAL PARASITIC BRONCHOPNEUMONIA BY METASTRONGYLUS ELONGATUS IN A PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 INFECTED PIG*

MARRUCHELLA G., SPERANZA R.

*Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze  
Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo ([gmarruchella@unite.it](mailto:gmarruchella@unite.it))*

**Parole chiave:** suino, broncopolmonite, nematodi, *Metastrongylus elongatus*, circovirus suino tipo 2.

**Key words:** swine, bronchopneumonia, nematodes, *Metastrongylus elongatus*, porcine circovirus type 2.

**Riassunto.** L'infezione sostenuta da PCV2 ha diffusione cosmopolita e le patologie ad essa correlate sono attualmente considerate tra quelle a più elevato impatto economico nella suinicoltura mondiale. PCV2 svolge un ruolo importante nell'eziologia del "complesso delle patologie respiratorie del suino", agendo spesso in stretta associazione con altri patogeni. Si riporta di seguito un episodio di co-infezione da PCV2 e *Metastrongylus elongatus* osservato in un suino deceduto spontaneamente ed appartenente ad un piccolo allevamento rurale. Le parassitosi bronco-polmonari da *Metastrongylus* spp. rappresentano ancora oggi una problematica sanitaria di una certa rilevanza negli allevamenti suinicoli "outdoor". La nostra recente esperienza suggerisce che tale problematica può essere amplificata in presenza di specifiche infezioni concomitanti (es. da PCV2) in grado di agire in modo sinergico.

**Summary.** PCV2 infection is worldwide distributed and PCV2-associated diseases are considered among the most economically relevant concerns affecting the global swine industry. PCV2 is known to play a role in porcine respiratory disease complex, usually in close association with a large plethora of other etiologic agents. We describe herein a fatal parasitic broncho-pneumonia by *Metastrongylus elongatus* in a PCV2-infected pig. *Metastrongylosis* could still represent a major concern in outdoor herds. Our recent experience suggests that concurrent infections – such as PCV2 – could trigger *metastrongylosis* thus resulting in severe, and sometime fatal, pulmonary disease.

### INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (*Porcine Circovirus type 2*, PCV2) è un piccolo virus a DNA monocatenario circolare, privo di *envelope*, classificato nella famiglia *Circoviridae* (gen. *Circovirus*). L'infezione sostenuta da PCV2 ha diffusione cosmopolita e le patologie ad essa correlate ("PCV2-associated diseases", PCVAD) sono attualmente considerate tra quelle a più elevato impatto economico nella suinicoltura mondiale (Gillespie *et al.*, 2009).

PCV2 è stato inizialmente riconosciuto quale agente causale della "sindrome da deperimento organico multisistemico post-svezzamento" del suino ("*post-weaning multisystemic wasting syndrome*", PMWS). Tuttavia, negli ultimi vent'anni il novero delle PCVAD si è notevolmente ampliato, comprendendo entità clinico-patologiche quali la sindrome dermatite-nefrite [("*porcine dermatitis and nephropathy syndrome*", PDNS (Rosell *et al.*, 2000)], l'enterite granulomatosa (Jensen *et al.*, 2006), turbe della sfera riproduttiva (West *et al.*, 1999) e dell'apparato respiratorio (Kim *et al.*, 2003), la linfadenite necrotizzante (Kim & Chae, 2005) ed alcune malattie

neurologiche (Correa *et al.*, 2007; Seeliger *et al.*, 2007). Una mole crescente di dati suggerisce che le infezioni sostenute da PCV2 vengono spesso complicate dall'intervento di altri agenti patogeni: virus (Pogranichniy *et al.*, 2002), batteri (Pallarès *et al.*, 2002), miceti (Clark, 1997), protozoi (Klein *et al.*, 2010).

La broncopolmonite verminosa (BPV) del suino è sostenuta da nematodi appartenenti al genere *Metastrongylus*, i quali impegnano il lume dei bronchi e dei bronchioli in prossimità dei margini caudo-dorsali di entrambi i polmoni. La BPV occorre esclusivamente laddove i suini hanno libero accesso al suolo e possono, pertanto, entrare in contatto con gli ospiti intermedi del parassita (lombrichi di terra). Le manifestazioni cliniche sono solitamente lievi o del tutto assenti e si osservano per lo più nei soggetti giovani (4-6 mesi di età) (Stewart & Hoyt, 2006).

Si riporta di seguito un episodio di co-infezione da PCV2 e *Metastrongylus elongatus* osservato in un suino deceduto spontaneamente ed appartenente ad un piccolo allevamento rurale.

## MATERIALI E METODI

Un suino di circa 4 mesi di età, deceduto spontaneamente dopo aver mostrato gravi disturbi respiratori e progressivi segni di deperimento, è stato conferito presso il “Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete dell'Università degli Studi di Teramo” e sottoposto ad indagine necroscopica. Il soggetto in questione proveniva da un piccolo allevamento “*outdoor*” nel quale si osservavano da alcuni mesi sindromi respiratorie croniche (tosse grassa, dispnea) e ridotte *performances* produttive. Le manifestazioni cliniche interessavano soggetti di tutte le età (dimostrandosi più gravi nei suini di 4-6 mesi) con elevata morbilità e bassa mortalità. In precedenza, non era stato eseguito alcun approfondimento diagnostico. Tuttavia, si era osservato un miglioramento parziale e transitorio a seguito di terapie antibiotiche individuali ad ampio spettro.

Durante la necroscopia, si è proceduto al campionamento di una vasta gamma di tessuti che sono stati fissati in formalina e processati come di *routine* per le successive indagini istologiche. In particolare, sono stati prelevati campioni rappresentativi di tutti i lobi di entrambi i polmoni, destinati anche alle indagini batteriologiche.

I nematodi bronco-polmonari prelevati in sede necroscopica sono stati fissati in etanolo 70% per la successiva caratterizzazione su base morfologica.

Sezioni di parenchima polmonare e linfonodale sono state, inoltre, sottoposte ad indagini immunoistochimiche volte ad evidenziare gli antigeni di PCV2. Tali indagini sono state eseguite seguendo un protocollo pubblicato e disponibile in letteratura (Kennedy *et al.*, 2000).

## RISULTATI

All'esame esterno, il suino oggetto di studio appariva estremamente emaciato. Le lesioni macroscopiche più rilevanti interessavano i polmoni, che apparivano entrambi non collassati, di colore grigio-rossastro e di consistenza aumentata. All'apertura della trachea e dei bronchi si notava la presenza di un gran numero di nematodi (*Metastrongylus* spp.) frammisti ad abbondante essudato catarrale.

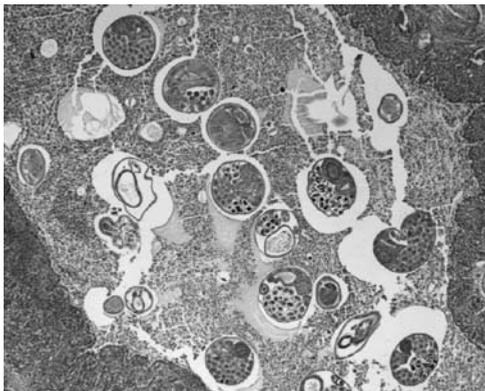
I linfonodi tracheo-bronchiali erano aumentati di volume ed edematosi. Sulla superficie epatica si notava la presenza delle cosiddette “macchie bianche”, riferibili alla migrazione delle larve di *Ascaris suum*.

Istologicamente, si è osservata la presenza di numerosi parassiti adulti nel lume di bronchi e bronchioli, circondati da un infiltrato infiammatorio costituito in larga parte da granulociti eosinofili e, in minor misura, da granulociti neutrofili, macrofagi e linfociti (Fig. 1). In tutti i campioni di tessuto polmonare si evidenziava una grave alveolite, caratterizzata dalla presenza di abbondante infiltrato infiammatorio strettamente associato alla presenza di un gran numero di uova e larve parassitarie [3-5 per campo visivo ad alto ingrandimento (Ob. X40)]. Talvolta, l'infiammazione assumeva i caratteri tipici della polmonite interstiziale. Di comune riscontro la

presenza di vaste aree di necrosi, contenenti residui parassitari e colonie batteriche, nonché di granulomi e di essudato purulento. A livello linfonodale era presente una marcata deplezione linfocitaria. Al centro di numerosi follicoli, come pure nei seni peri-trabecolari, si osservavano numerose cellule giganti multinucleate ed epiteliodi.

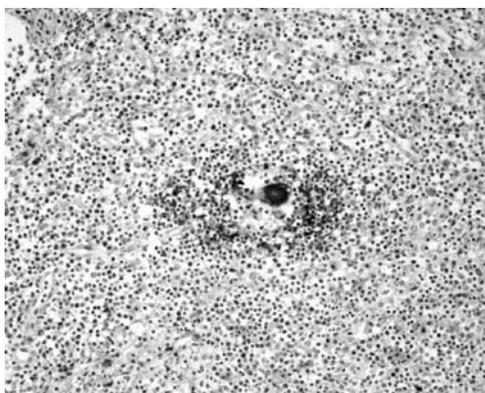
Le indagini batteriologiche hanno portato all'isolamento di streptococchi  $\beta$ -emolitici. Tutti i parassiti esaminati appartenevano alla specie *Metastrongylus elongatus*.

Le indagini immunohistochimiche hanno dimostrato la presenza di grandi quantità di antigeni di PCV2 in tutti i tessuti oggetto di studio. In sede linfonodale, l'immunoreattività coinvolgeva soprattutto macrofagi, elementi sinciziali e cellule follicolari dendritiche (Fig. 2). L'immunoreattività per PCV2 era intensa e specifica anche in sede polmonare all'interno di diversi citotipi (macrofagi alveolari, sincizi, cellule dell'epitelio bronchiale/bronchiolare).



**Fig.1. Suino. Polmone.** Il lume di un bronco contiene numerosi nematodi adulti, frammisti a muco ed abbondante infiltrato infiammatorio. Ematossilina-Eosina (Ob. X4).

**Fig. 1. Swine. Lung.** Bronchial lumen filled with lungworms, leucocyte infiltration and mucus. Hematoxylin and Eosin stain. Final magnification (Ob. X4).



**Fig. 2. Suino. Linfonodo tracheo-bronchiale.** Antigeni di PCV2 all'interno dei macrofagi e dei sincizi che infiltrano un follicolo linfatico. Immunohistochimica per PCV2, colorazione di contrasto con Ematossilina di Meyer (Ob. X20).

**Fig. 3. Swine. Lymph node.** Large amounts of PCV2 antigen within macrophages and syncytia, which densely infiltrated the germinal centre of a lymphoid follicle. Immunohistochemical technique with Meyer's haematoxylin counterstain. (Ob. X20).

## DISCUSSIONE

PCV2 svolge un ruolo importante nell'eziologia del "complesso delle patologie respiratorie del suino" ("Porcine Respiratory Disease Complex", PRDC) (Kim *et al.*, 2003), agendo spesso in stretta associazione con altri patogeni (Gillespie *et al.*, 2009). La patogenesi delle PCVAD è complessa e non ancora decifrata. Si ritiene che condizioni di immunostimolazione e di immunodepressione siano entrambe in grado di favorire la comparsa di PCVAD (Krakowka *et al.*, 2001; Segales *et al.*, 2004).

L'episodio qui descritto suggerisce un potenziale sinergismo d'azione fra PCV2 e parassiti (*Metastrongylus elongatus*). Come precedentemente ipotizzato da Klein *et al.* (2010), è ragionevole ritenere che l'intensa immunostimolazione indotta dai metastrongili possa aver favorito la replicazione di PCV2, aumentando il substrato cellulare specificamente utilizzato dal virus. D'altra parte, l'infezione sostenuta da PCV2 può aver compromesso la risposta immunitaria anti-parassitaria, con le conseguenze clinico-patologiche sopra descritte.

Le parassitosi bronco-polmonari da *Metastrongylus* spp. rappresentano ancora oggi una problematica sanitaria di una certa rilevanza negli allevamenti suinicoli "outdoor". Il ruolo eziologico dei metastrongili nell'episodio qui descritto è supportato dall'efficacia della terapia anti-parassitaria successivamente messa in atto. La nostra recente esperienza suggerisce che tale problematica può essere amplificata, oltre che dalla presenza di specifici fattori "manageriali" in grado di incrementare la carica parassitaria, anche dalla presenza di infezioni concomitanti in grado di agire in modo sinergico.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dott.ssa Barbara Paoletti (Dip.to Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi di Teramo) per la caratterizzazione su base morfologica dei parassiti bronco-polmonari.

## BIBLIOGRAFIA

1. Clark EG (1997) Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 28, 499-501.
2. Corrêa AM, Zlotowski P, de Barcellos DE, da Cruz CE, Driemeier D (2007) Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 109-112.
3. Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V (2009) Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23,1151-1163.
4. Jensen TK, Vigre H, Svensmark B, Bille-Hansen V (2006) Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis. *Journal of Comparative Pathology* 135, 176-182.
5. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM (2000) Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 122, 9-24.
6. Kim J, Chung HK, Chae C (2003) Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Veterinary Journal* 166, 251-256.
7. Kim J, Chae C (2005) Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Veterinary Record* 156, 1777-1778.
8. Klein S, Wendt M, Baumgärtner W, Wohlsein P (2010) Systemic toxoplasmosis and concurrent porcine circovirus-2 infection in a pig. *Journal of Comparative Pathology* 142, 228-234.

9. Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G (2001) Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology* 38, 31-42.
10. Pallarés FJ, Halbur PG, Opriessnig T, Sorden SD, Villar D, Janke BH, Yaeger MJ, Larson DJ, Schwartz KJ, Yoon KJ, Hoffman LJ (2002) Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 515-9.
11. Pogranichniy RM, Yoon KJ, Harms PA, Sorden SD, Daniels M (2002) Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 449-456.
12. Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodríguez-Arrijoja GM, Duran CO, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M (2000) Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record* 146, 40-43.
13. Seeliger FA, Brugmann ML, Kruger L, Greiser-Wilke I, Verspohl J, Segales J, Baumgartner W (2007) Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Veterinary Pathology* 44, 621-634.
14. Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E (2004) Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology* 98, 151-158.
15. Stewart TB, Hoyt PG (2006) Internal parasites. In: *Disease of Swine*, 9th Edit., B Straw, JJ Zimmermann, S D'Allaire, DJ Taylor, Eds., Blackwell Publishing, Oxford, pp. 901-914.
16. West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA (1999) Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 530-532.

# VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELLA MUSCOLATURA LISCIA BRONCHIOLARE IN POLMONI NORMALI E PATOLOGICI DI SUINO – INDAGINI PRELIMINARI

## ***QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BRONCHIOLAR SMOOTH MUSCLE IN HEALTHY AND DISEASED PORCINE LUNGS – PRELIMINARY INVESTIGATIONS***

MARRUCHELLA G.

*Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Piazza Aldo Moro 45, 64100, Teramo ([gmarruchella@unite.it](mailto:gmarruchella@unite.it))*

**Parole chiave:** suino, cinghiale, bronchioli, muscolatura liscia.

**Key words:** *pig, wild boar, bronchioles, smooth muscle cells.*

**Riassunto.** L'aumento di spessore della muscolatura liscia bronchiolare (MLB) caratterizza diverse pneumopatie di grande interesse in patologia umana e veterinaria. I risultati del presente studio dimostrano che l'estensione della MLB si modifica significativamente nel corso di diverse pneumopatie infiammatorie del suino e del cinghiale. In particolare, i dati qui raccolti dimostrano l'ispessimento della MLB in corso di broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp., a conferma di quanto da più parti riportato sulla base di valutazioni individuali soggettive. Ulteriori indagini sono indispensabili per chiarire le modificazioni – sia qualitative sia quantitative – che coinvolgono la MLB, nonché la muscolatura liscia residente nei bronchi, nei bronchioli terminali e nei condotti alveolari.

**Summary.** *Bronchiolar smooth muscle (BSM) thickening characterizes a number of relevant lung diseases, which affect humans and animals. The present study demonstrates that BSM thickness significantly modifies in the course of different inflammatory lung diseases, in pigs and wild boars. More in detail, data reported herein confirm a significant BSM thickening in parasitic bronchopneumonia affected lungs. Further investigations are needed to clarify the changes - both from a qualitative and quantitative point of view - affecting BSM, as well as smooth muscle cells residing within bronchi, terminal bronchioles and alveolar ducts.*

### INTRODUZIONE

I bronchioli derivano dalla ramificazione dicotomica dei bronchi, non hanno alcun supporto cartilagineo e non posseggono cellule a secrezione mucosa. La parete è composta da una rete di fibre collagene ed elastiche, nonché da alcuni strati di cellule muscolari lisce disposti a spirale. Caratteristica istologica comune nei piccoli bronchi e nei bronchioli (primari e secondari) è la marcata invaginazione della mucosa, che si solleva in pliche longitudinali. Questo aspetto tende a scomparire in diverse condizioni patologiche, acute e croniche (Dellmann, 1981; Marcato, 2002).

Le funzioni svolte “fisiologicamente” dalla muscolatura liscia bronchiolare (MLB) sono tuttora controverse. Per contro, il ruolo della MLB è paradossalmente ben noto in alcune condizioni patologiche quali l'asma bronchiale dell'uomo, che si caratterizza per un aumento della massa della MLB. Tale aumento è da attribuire all'iperplasia della MLB ed a variazioni quali-quantitative della matrice extra-cellulare, mentre

sull'eventuale ipertrofia delle cellule della MLB esistono pareri discordanti (Bara *et al.*, 2010).

L'ipertrofia/iperplasia della MLB caratterizza anche alcune pneumopatie d'interesse veterinario (es. broncopolmoniti parassitarie, Maedi-Visna) (Stockdale, 1976). Tuttavia, tale aspetto – pure importante dal punto di vista patogenetico – non è supportato da dati oggettivi in grado di confermarne l'esistenza e di quantificarne l'entità.

L'indagine qui riportata ha perseguito l'obiettivo di valutare quantitativamente la "massa" della MLB, in condizioni normali e patologiche, nel suino domestico (*Sus domesticus*) e nel cinghiale (*Sus scrofa*).

## **MATERIALI E METODI**

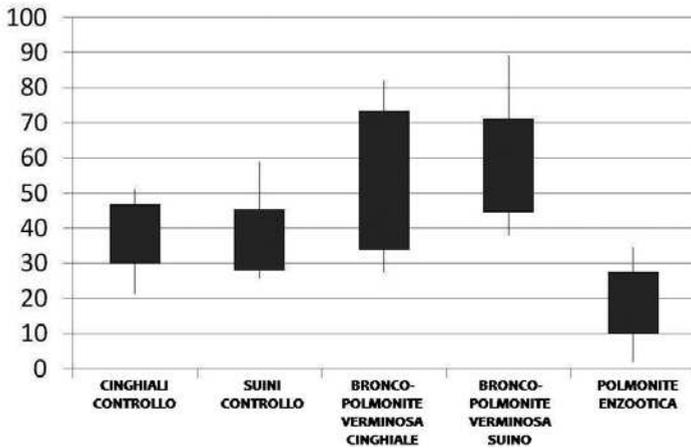
Sono stati inclusi nello studio i seguenti tessuti archiviati presso il "Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate" dell'Università degli Studi di Teramo:

1. campioni di parenchima polmonare "normali" – vale a dire privi di quadri lesivi rilevabili macroscopicamente e microscopicamente – prelevati da suini domestici di 9 mesi di età ( $n^{\circ} = 4$ ) e da cinghiali di 6-12 mesi di età ( $n^{\circ} = 4$ ), tutti regolarmente macellati;
2. campioni di parenchima polmonare affetti da broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp. – prelevati da suini domestici di 9 mesi di età ( $n^{\circ} = 4$ ) e da cinghiali di 6-12 mesi di età ( $n^{\circ} = 4$ ), tutti regolarmente macellati;
3. campioni di parenchima polmonare affetti da polmonite enzootica – prelevati da suini domestici di 9 mesi di età ( $n^{\circ} = 4$ ) regolarmente macellati.

Tutti i tessuti sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo (5  $\mu\text{m}$ ), colorati con ematossilina-eosina ed osservati al microscopio ottico. Da ciascun campione sono state ottenute ed osservate 3 sezioni. Le immagini di tutti i bronchioli primari e secondari sezionati trasversalmente sono state acquisite (Microscopio *Nikon Eclipse 800*; Fotocamera *Digitale Nikon DXM 1200*) ed analizzate mediante *ImageJ Software*. I dati relativi all'estensione dei bronchioli e della MLB sono stati riportati su un foglio di calcolo "*Microsoft Office Excel 2007*" ed elaborati statisticamente (Test "*t*" di *Student*).

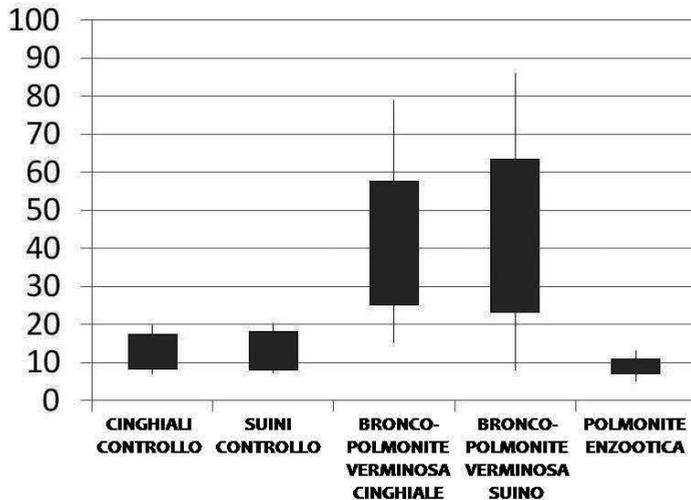
## **RISULTATI**

Il diametro medio dei bronchioli esaminati è risultato compreso fra 150,6  $\mu\text{m}$  e 252,2  $\mu\text{m}$ . I dati relativi allo spessore ed all'estensione della MLB – valutata dapprima in termini assoluti e quindi espressa in % rispetto alla superficie totale del bronchiolo – sono graficamente rappresentati nelle Fig. 1 e 2. L'analisi statistica dimostra che la MLB è significativamente più estesa e più spessa in corso di broncopolmonite verminosa, sia nei suini domestici che nei cinghiali. Per contro, l'estensione e lo spessore della MLB appaiono significativamente ridotti in corso di polmonite enzootica.



**Fig. 1. Estensione della MLB espressa in % rispetto alla superficie totale dei bronchioli.** Sono graficamente rappresentati le medie  $\pm$  deviazione standard, i valori massimi e minimi. La MLB è significativamente aumentata in corso di broncopolmonite verminosa ( $p \leq 0.01$ ) e ridotta in corso di polmonite enzootica ( $p \leq 0.01$ ) rispetto ai soggetti di controllo.

*Fig. 1. BSM estimated as % of bronchioles total surface. Means  $\pm$  standard deviation, maximum and minimum values are graphically represented. BSM appears significantly increased in parasitic broncho-pneumonia affected lungs ( $p \leq 0.01$ ), and reduced in enzootic pneumonia affected lungs ( $p \leq 0.01$ ), when compared with healthy controls.*



**Fig. 2. Spessore della MLB espresso in micron.** Sono graficamente rappresentati le medie  $\pm$  deviazione standard, i valori massimi e minimi. Lo spessore della MLB è significativamente aumentato in corso di broncopolmonite verminosa ( $p \leq 0.01$ ) e ridotto in corso di polmonite enzootica ( $p \leq 0.01$ ) rispetto ai soggetti di controllo.

*Fig. 2. BSM thickness in microns. Means  $\pm$  standard deviation, maximum and minimum values are graphically represented. BSM thickness appears significantly increased in parasitic broncho-pneumonia affected lungs ( $p \leq 0.01$ ), and reduced in enzootic pneumonia affected lungs ( $p \leq 0.01$ ), when compared with healthy controls.*

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le cellule della MLB sono estremamente plastiche e svolgono molteplici funzioni – ben oltre la semplice attività contrattile – contribuendo in tal modo al “rimodellamento” delle vie aeree nel corso di diverse condizioni patologiche. Di fatto, le cellule della MLB possono essere considerate a pieno titolo “cellule infiammatorie” in grado di produrre una vasta gamma di citochine e chemochine che sostengono importanti interazioni, soprattutto nei riguardi di mastociti e linfociti T (Bara *et al.*, 2010). Il ruolo della MLB nella patogenesi dell’asma dell’uomo è da tempo oggetto di approfondite indagini. Per contro, sono piuttosto esigui i dati riguardanti il ruolo della MLB nelle patologie respiratorie d’interesse veterinario.

I risultati della presente indagine dimostrano che, anche in condizioni fisiologiche, la MLB costituisce una componente “quantitativamente” rilevante della parete bronchiolare. L’estensione della MLB si modifica significativamente nel corso di diverse pneumopatie infiammatorie del suino. In particolare, i risultati ottenuti confermano in modo oggettivo l’ispessimento della MLB nei polmoni affetti da broncopolmonite verminosa da *Metastrongylus* spp., supportando quanto da più parti riportato sulla base di valutazioni individuali soggettive.

L’atrofia della MLB non viene annoverata fra le caratteristiche istopatologiche della polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tuttavia, dai risultati ottenuti si evince che, in presenza di lesioni tipicamente riconducibili all’infezione da *M.hyopneumoniae* (grado 3-4 della classificazione proposta da Livingston *et al.*, 1972), la MLB mostra una significativa riduzione della propria estensione e del proprio spessore. Verosimilmente, ciò potrebbe essere la diretta conseguenza dell’effetto compressivo esercitato dall’essudato che si accumula del lume bronchiolare, da un lato, e dal BALT iperplastico, dall’altro. L’atrofia della MLB potrebbe, a sua volta, contribuire al ristagno dell’essudato creando così una sorta di circolo vizioso che favorirebbe la cronicizzazione della flogosi e l’insorgenza di complicanze settiche.

In realtà, l’iperplasia del BALT e l’accumulo di essudato nei bronchi/bronchioli caratterizzano anche la broncopolmonite verminosa nel corso della quale si osserva, per contro, l’ispessimento della MLB. Precedenti indagini hanno dimostrato che, sempre in corso di metastrongilosi, le cellule della MLB acquisiscono la capacità di esprimere l’enzima 5-lipossigenasi (5-LOX), contribuendo in tal modo alla sintesi di leucotrieni, mediatori chimici della flogosi d’importanza cruciale (Marruchella *et al.*, 2010). È ragionevole ipotizzare che gli stessi leucotrieni – notoriamente in grado di indurre broncospasmo – possano stimolare il broncospasmo e – a lungo andare – possano contribuire all’ispessimento della MLB attraverso un meccanismo di tipo autocrino.

Ulteriori indagini sono indispensabili per meglio precisare le modificazioni quali-quantitative a carico della muscolatura liscia presente nei bronchi, nei bronchioli e nei condotti alveolari nel corso di pneumopatie infiammatorie del suino a differente eziopatogenesi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bara I., Ozier A., Tunon de Lara J.M., Marthan R., Berger P. (2010) Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *European Respiratory Journal* **36**, 1174-1184.
2. Dellmann H.D. (1981) “Apparecchio Respiratorio”. In “*Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria*”, Dellmann H.D., Brown E.M., Editoriale Grasso (Bologna, Italia), 186-202.
3. Livingston C.W., Stair E.L., Underdahl, N.R. (1972) Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *American Journal of Veterinary Research* **33**, 2249-2258.
4. Marcato P.S. (2002) “Sistema Respiratorio – Strutture e Funzioni dell’Apparato Respiratorio”. In “*Patologia Sistematica Veterinaria*”, Marcato P.S., Edagricole (Bologna, Italia), 413-435.
5. Marruchella G., Giacomini-Stuffler R., Baffoni M., Maccarrone M. (2010) 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in porcine parasitic bronchopneumonia: immunohistochemical and biochemical investigations. *Journal of Comparative Pathology* **142**, 139-146.
6. Stockdale H.G. (1976) Pulmonary pathology associated with metastrongyloid infections. *British Veterinary Journal* **132**, 595-608.

# USO METAFILATTICO DI DRAXXIN® CONTRO L'ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE (APP) IN FORMA CLINICA IN SUINI DA INGRASSO: CONFRONTO CON USO DI AMOXICILLINA NELL'ALIMENTO

## ***METAPHILACTIC USE OF DRAXXIN® AGAINST CLINICAL ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE (APP) IN FATTENING PIGS: COMPARISON WITH THE AMOXICILLIN IN FEED***

NANJIANI I.A.<sup>1</sup>, MORALES J.<sup>2</sup>, PIÑEIRO C.<sup>2</sup>, MANSO A.<sup>2</sup>, WUYTS N.<sup>3</sup>, BECCALOSSO M.<sup>4</sup>, DONCECCHI P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pfizer Ltd. VMRD, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, United Kingdom

<sup>2</sup>PigCHAMP Pro Europa S.A. C/Gremio de los Segovianos, 13, Pol. Ind. Hontoria, 40006 Segovia, Spain

<sup>3</sup>Pfizer Ltd. EUAfME, 23-25 avenue du Docteur Lannelongue F-75668 Paris Cedex 14, France

<sup>4</sup>Pfizer Animal Health Italia Srl, Via Valbondione 113, 00188 Roma, Italia

**Parole Chiave:** APP, Ingrasso, Metafilassi, Draxxin, Tulatromicina

**Keywords:** APP, Fattening Pigs, Metaphylaxis, Draxxin, Tulathromycin

**Riassunto.** Questo studio randomizzato, in cieco e con controllo positivo, è stato condotto per valutare l'efficacia della Tulatromicina (Draxxin®) come trattamento metafilattico verso *Actinobacillus Pleuropneumoniae* a fronte di un grave episodio acuto nella fase di ingrasso in un'azienda con una verificata storia clinica di APP, attraverso il confronto di due gruppi trattati in metafilassi: un gruppo trattato con Draxxin®, e un altro gruppo con amoxicillina nel mangime. Sono stati inclusi nello studio 320 suini divisi in 32 box. La valutazione è stata effettuata sulla base della risoluzione clinica della patologia e su parametri di performance. Nel confronto con il trattamento mediante Amoxicillina per via orale, Draxxin® ha favorito un maggiore AMG e IMG nei primi 30 giorni, benché queste differenze non siano state significative nell'intero periodo dello studio. I suini trattati con Draxxin® necessitano di meno iniezioni di antibiotico contro l'SRD (35,7% vs 53,6%; P=0.08), e hanno meno ricadute (10,5% vs 30,8%; P=0.0005) dei suini trattati con Amoxicillina. Non c'è stata differenza nella mortalità riferita ad APP, ma numericamente è stata più bassa nel gruppo Draxxin® rispetto al gruppo Amoxicillina (2,6% vs 3,4%). In macello i suini trattati con Draxxin® hanno mostrato una più bassa % di lesioni polmonari e di pleuriti dei suini trattati con Amoxicillina, benché la differenza non fosse statisticamente significativa. Possiamo concludere che l'uso di una singola iniezione di Tulatromicina come trattamento metafilattico per APP aumenta la sanità della popolazione trattata rispetto ad un approccio tradizionale di intervento. Questo programma di metafilassi presenta un uso responsabile e mirato di prodotti antimicrobici in aziende con episodi gravi e acuti di APP.

**Abstract.** This randomised, blinded, positively controlled study was performed to assess the efficacy of Tulathromycin (Draxxin®) as a metaphylactic treatment against *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) in the face of a severe acute disease outbreak in the fattening period on a farm with an established history of APP, by comparison of two groups of piglets treated metaphylactically; one group with Draxxin®, and one group with in-feed amoxicillin. A total 320 pigs housed in 32 pens were used. Evaluation was based on the clinical resolution of APP and on performance parameters. In comparison with Amoxicillin in-feed treatment,

Draxxin promoted significantly higher ADG and FI in the first 30-days period, although these differences were not significant over the whole experimental period. Pigs treated with Draxxin required fewer antibiotic injections against SRD (35.7% vs 53.6%; P=0.08), and relapsed less (10.5% vs 30.8%; P=0.0005) than pigs receiving in-feed Amoxicillin. Mortality related to APP did not differ between treatments, but was numerically lower with Draxxin than in Amoxicillin group (2.6% vs 3.4%). At the slaughterhouse, pigs treated with Draxxin had a lower proportion of lung lesions and of adhesions in pleura than pigs treated with Amoxicillin, although these differences did not reach statistical significance. We conclude that the use of a single injection of tulathromycin as metaphylaxis treatment for APP improved the health of the treated population when compared to a conventional intervention approach, therefore this metaphylaxis program represents a responsible and targeted use of antimicrobial products in pig farms in the face of a severe, acute APP outbreak.

## **INTRODUZIONE**

La malattia respiratoria nel suino (SRD) è una patologia complessa causata da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, e altri microrganismi patogeni, che può influenzare in modo importante le performance economiche e il benessere fisico degli animali colpiti.

La Tulatromicina, il componente attivo di Draxxin®, ha dimostrato tutta la sua efficacia contro le infezioni da *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* nei suini a seguito di una singola somministrazione. Draxxin® è registrato per il trattamento metafilattico contro il complesso SRD nel momento di insorgenza della patologia, è quindi possibile attendersi che un trattamento metafilattico somministrato a suini in accrescimento con sintomi iniziali di SRD, possa controllare l'infezione e possa avere un effetto benefico sulla loro crescita. Il tempo di attesa di Draxxin® è 33 giorni, tale trattamento dovrebbe essere quindi limitato nei primi 2/3 della fase di ingrasso.

L'amoxicillina è altresì comunemente utilizzata per il trattamento/controllo dell'SRD negli allevamenti da ingrasso, grazie al suo ampio spettro e alle diverse forme farmaceutiche disponibili, come premiscele, solubili in acqua o iniettabili. L'amoxicillina sarà usata quindi come controllo positivo nel presente studio.

Questo studio si pone l'obiettivo di indagare i benefici dell'uso di Draxxin® in metafilassi durante un grave e acuto episodio di APP in un allevamento con storicità di infezione nel periodo di magronaggio-ingrasso, attraverso il confronto di due gruppi di suini; un gruppo trattato metafilatticamente con Draxxin® ai primi sintomi della malattia, e un gruppo controllo trattato metafilatticamente con amoxicillina nel mangime nello stesso momento. La valutazione dei risultati è stata basata sull'incidenza di APP nei parametri di performance, come l'incremento di peso, le condizioni intercorrenti, l'uso di medicazioni e la mortalità, registrati dal giorno del trattamento (giorno 0) al giorno 30, e fino alla macellazione. Gli animali sentinella non hanno ricevuto trattamenti metafilattici e sono stati allevati negli stessi ambienti per dimostrare la presenza della malattia; all'insorgenza dei sintomi di malattia sono stati trattati con amoxicillina iniettabile.

## **MATERIALI E METODI**

La presenza dei patogeni target è provata da isolamenti batterici effettuati in polmoni di suini morti per patologia respiratoria prima dell'inizio dello studio, dalle lesioni polmonari accertate in macello, e da materiale diagnostico di casi clinici raccolto durante lo studio stesso. Sono stati usati un totale di 320 suini divisi in 32 box (10 suini per box). I suini sono stati divisi in 4 diverse stanze (8 box per stanza), e ogni stanza è stata inclusa nello studio quando circa il 20% dei suini della stanza stessa mostrava sintomi respiratori

compatibili con APP e almeno il 75% dei box conteneva suini sintomatici (Giorno 0). Le diverse stanze sono state incluse nello studio in tempi diversi, una volta che si è dimostrata la presenza di sintomi clinici della malattia nella stanza stessa.

### **Progetto dello studio**

I 32 box sono stati destinati casualmente a: T01 – 14 box (140 suini) trattati metafilatticamente al giorno 0 (il giorno in cui la malattia ha raggiunto le soglie descritte) con Draxxin® in singola somministrazione a 2,5mg/kg di peso vivo; T02 - 14 box (140 suini), gruppo controllo positivo trattato metafilatticamente con amoxicillina nel mangime al Giorno 0 (20 mg/kg P.v. per 5 giorni); o a T03 - 4 box (40 suini), gruppo sentinella in cui i soggetti sono stati trattati individualmente con amoxicillina all'insorgere della sintomatologia respiratoria. Il trattamento metafilattico è iniziato quando almeno il 20% dei suini nella stanza ha mostrato sintomi respiratori compatibili con APP e almeno il 75% dei box conteneva suini con questi sintomi clinici (giorno 0), in modo che la presenza della malattia fosse confermata prima dell'inizio dello studio. Tutti i suini sono stati pesati al giorno 0 prima dei trattamenti, al giorno 5, 30 e il giorno prima della macellazione. Nel gruppo T01, il peso al giorno 0 è stato usato per determinare la corretta dose di Draxxin® da somministrare. Ogni suino (T01, T02 e T03) diagnosticato con SRD durante il periodo di osservazione è stato trattato con un trattamento standard: amoxicillina iniettabile (Duphamox LA; Fort Dodge Veterinaria SA), alla dose raccomandata, ripetuta dopo 48 ore se necessario.

### **Raccolta Dati**

Tutti i suini sono stati pesati al Giorno 0, al Giorno 5 dopo la somministrazione di amoxicillina nel mangime al gruppo T02, al giorno 30, e il giorno prima della macellazione per calcolare la resa della carcassa. Il consumo di alimento per box è stato registrato in modo costante, ed è stato usato per calcolare gli indici di conversione (Periodi: Giorno 0 – Giorno 5, Giorno 5 – Giorno 30 e Giorno 0 – Giorno 30). Gli animali sono stati osservati quotidianamente fino alla macellazione alla ricerca di sintomi di malattia, se necessario sottoposti a trattamento e il trattamento stesso documentato. Ogni suino morto o sottoposto ad eutanasia durante lo studio è stato sottoposto ad esame. In caso di decesso riferibile a SRD sono stati raccolti dei tamponi polmonari per identificare i patogeni responsabili.

### **Analisi Statistica e delle variabili**

I trattamenti sono stati somministrati sulla base dell'intero box, le variabili sono state quindi calcolate sulla base dei box (non su base individuale), e i valori dei box sommati e analizzati per trattamento.

I parametri usati per dimostrare l'efficacia della Metafilassi con Draxxin® nei confronti dell'SRD sono l'accrescimento medio giornaliero (AMG), l'ingestione media giornaliera (IMG) e l'indice di conversione dell'alimento (IC) tra il giorno 0 e il giorno 30; il numero di iniezioni per trattamenti, la mortalità relativa di ciascun gruppo, e i giorni di occupazione della stalla. L'analisi statistica è stata condotta usando un modello incrociato in SAS® version 9, assumendo l'effetto fisso del trattamento e l'effetto casuale della stanza.

### **RISULTATI**

Le analisi sierologiche hanno confermato un'alta esposizione ad APP (66% alla fine del periodo di studio), a *Haemophilus parasuis* (94%) e a *Mycoplasma* (59%).

Gravi sintomi di malattia respiratoria sono stati osservati nelle quattro stanze di suini inclusi nello studio. Gli isolamenti di patogeni effettuati sui soggetti deceduti (tamponi polmonari da suini con SRD) comprendono soprattutto *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Parametri produttivi: In confronto con il trattamento Amoxicillina nel mangime, Draxxin® ha promosso valori più alti di AMG e IMG nei primi 30 giorni (Tabella 1 e 2). Nel primo periodo di prova, l'AMG nel T01 è stato tendenzialmente più alto (717 vs 678 g/d; P=0.060) e anche l'IMG è stata più alta (1652 vs 1544 g/d; P=0.085) così come il peso vivo (60.6 vs 59.4 kg; P=0.063) verso T02. Tuttavia, nell'intero periodo sperimentale non si sono osservate differenze nell'AMG e nell'IMG. I giorni di occupazione della stalla non hanno avuto differenze tra i trattamenti (178 vs 181 giorni nel gruppo Draxxin e Amoxicillina, rispettivamente; P=0.197).

Parametri riferiti ad SRD: Il numero di suini che hanno avuto bisogno di iniezioni di antibiotico per SRD (Tabella 3), tende ad essere più basso in T01 che in T02 nell'intero periodo (35.7% vs 53.6%; P=0.081). In più, i suini del gruppo T02 hanno avuto più ricadute di quelli del gruppo T01 (10.5% vs 30.8%; P=0.0005), e la percentuale dei suini trattati 3 o più volte è stata egualmente più alta nel gruppo T02 (Amoxicillina: 14.3% vs 3.5%; P=0.030) che nel gruppo T01 (Draxxin®). La mortalità è stata principalmente causata dalla malattia legata ad APP, ed è stata più alta nel gruppo Amoxicillina (2.6% vs 3.4%; P=0.53) che nel gruppo Draxxin®.

Nella punteggiatura polmonare al macello (Figura 1) i suini trattati con Draxxin® hanno mostrato un numero più basso di lesioni polmonari (28.6% vs 45.4%; P=0.16) e di aderenze pleuriche (50.7% vs 61.2%; P=0.23), anche se queste differenze non sono state statisticamente significative.

## DISCUSSIONE

Garantire che ogni animale riceva la giusta dose di prodotto è fondamentale, ciò è favorito dall'immissione in commercio di diversi antibiotici a lunga azione e a largo spettro. Infatti, questi prodotti permettono il trattamento di un gruppo a rischio all'interno di una popolazione di suini, garantendo un dosaggio accurato e mirato sul singolo animale, e il loro utilizzo in metafilassi è diventato comune nella realtà di campo. L'efficacia sarà migliore se il prodotto scelto avrà una sufficiente durata di azione per coprire il periodo di attività della patologia attesa e un appropriato spettro di attività. La Tulatromicina è indicata per l'uso metafilattico in animali a rischio di sviluppare patologia nell'arco di 2 o 3 giorni, e dal suo utilizzo nel trattamento delle malattie respiratorie del magronaggio-ingrasso ci si possono attendere ottimi risultati. Nei primi studi, la metafilassi con Tulatromicina ha ridotto la morbilità riferita all'SRD e le conseguenti ricadute, se confrontata con trattamenti metafilattici nel mangime con utilizzo di Doxicicilina o Amoxicillina, e ha altresì aumentato i risultati economici del gruppo.

In questo studio è stata valutata l'efficacia metafilattica di Draxxin® in presenza di un caso acuto e grave di APP. L'SRD è stata confermata dalle osservazioni cliniche e dagli isolamenti di patogeni respiratori (spt. *A. pleuropneumoniae*) e i risultati mostrano il valore di un trattamento metafilattico con Tulatromicina, il quale ha avuto risultati tendenzialmente migliori per quanto riguarda l'incremento di peso e ha significativamente ridotto gli ulteriori trattamenti antibiotici e il numero di lesioni polmonari al macello.

## CONCLUSIONI

Questo studio controllato e randomizzato condotto in condizioni di campo, ha permesso di dimostrare il valore di una singola iniezione di Tulatromicina in metafilassi in caso di episodi acuti e gravi di APP nel magronaggio-ingrasso, permette di migliorare la sanità della popolazione trattata se confrontata con un convenzionale approccio "di intervento". Di conseguenza, questo programma di metafilassi mostra un uso responsabile e mirato di prodotti antimicrobici in aziende di suini a rischio di sviluppare episodi acuti e gravi di APP.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori riconoscono il supporto finanziario di Pfizer Animal Health che ha finanziato interamente questa ricerca. PigCHAMP Pro Europa collabora come consulente per Pfizer Animal Health in diversi progetti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Palzer, A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. (2005) **Erregernachweis aus bronchoalveolärer Lavage bei Schweinen mit Atemwegserkrankungen.** *Tierärztliches Umschau*, **60**: 550-556.
2. Evans, N.A. (2005) **Tulathromycin: an overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease.** *Veterinary Therapeutics.*, **6** (2): 83-95.
3. McKelvie J, Morgan J, Nanjiani I, Sherington J, Rowan T, Sunderland S. (2005). **Evaluation of Tulathromycin for the treatment of pneumonia following experimental infection of swine with *Mycoplasma hyopneumoniae*.** *Veterinary Therapeutics.* 2005, **6** (2): 197-202.
4. Bradford, J and Nutsch, R. **Evaluation of tulathromycin injectable solution for the treatment of experimentally-induced *Mycoplasma pneumoniae* in pigs.** In *Proceedings of the Lemman Swine Conference: 15-18 September 2007.*
5. Nanjiani, I, McKelvie J, Benchaoui H, Godinho K, Sherington J, Sunderland S, Weatherley A, Rowan T. (2005) **Evaluation of the therapeutic activity of Tulathromycin against Swine Respiratory Disease on farms in Europe.** *Veterinary Therapeutics.* Vol. **6** (2): 203-213.
6. Pabst, T. (2005) **Wiederkehrende Atemwegsinfektionen beim Mastschwein Optimierung der Therapie mit Draxxin®.** *Grosstierpraxis.* 2007, **8** (5): 182-185.
7. Nutsch R, Hart F, Rooney K, Weigel D, Kilgore W, Skogerboe T. (2005) **Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring swine respiratory disease.** *Veterinary Therapeutics*, **6** (2): 214-225.
8. Allerson M, Deen J, Rutten S. **Efficacy of tulathromycin for the treatment of at risk nursery pigs.** In *Proceedings of American Association of Swine Veterinarians.* 2007, 71-72.
9. Toutain, P.L. **Role of PK/PD in Veterinary Drug Development.** *14th Biennial Symposium American Academy of Veterinary and Therapeutics - Veterinary Pharmacology Rockville USA.* 2005.
10. Bermúdez V, Tonelli T, Escalona M, Morales A. **A Field study to Evaluate Tulathromycin in Site II-III farm PRRS- and PCV2AD+ (PNDs) with a high mortality rate by *Mycoplasma, A. pleuropneumoniae* & *H. parasuis* in Venezuela.** In *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress: 22-26 June 2008,* P5.027.

**Tabella 1.** *Peso vivo, accrescimento medio giornaliero e giorni di occupazione*

	Giorni 0-5		Giorni 5-30		Giorni 0-Macellazione		
	PV5	AMG (g/d)	PV30	AMG (g/d)	PV Finale	AMG (g/d)	Giorni Occupazione
<b>T1-DRAXXIN</b>	43.6	907.6	60.6	679.4	104.6	801.9	178.4
<b>T2-AMOXI</b>	43.5	889.9	59.4	635.4	104.8	790.1	180.8
<i>SEM</i> <sup>1</sup>	0.195	38.23	1.140	23.76	1.369	14.76	4.572
<i>P TREAT</i>	0.735	0.749	0.0625	0.0297	0.940	0.580	0.197

<sup>1</sup>Standard error of mean (n=18)

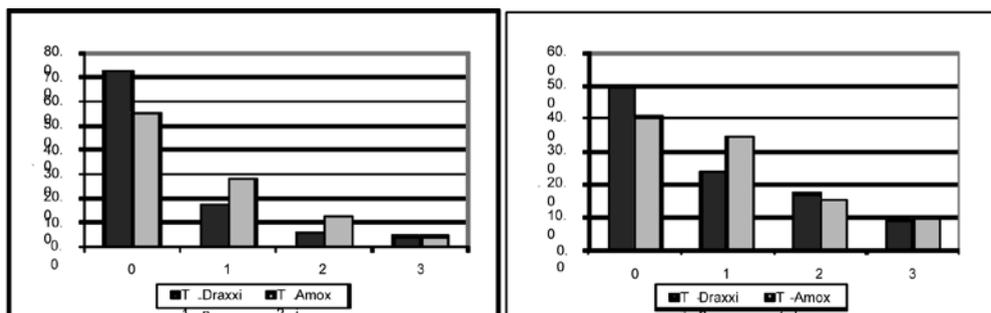
**Tabella 2.** *Ingestione media giornaliera e indice di conversione*

	Giorni 0-5		Giorni 5-30	
	IMG (g/d)	IC (g/g)	IMG (g/d)	IC (g/g)
<b>T1-DRAXXIN</b>	1730.0	1.956	1636.7	2.451
<b>T2-AMOXI</b>	1633.4	1.931	1527.4	2.424
<i>SEM</i>	80.99	0.125	52.41	0.071
<i>P TREAT</i>	0.353	0.837	0.120	0.794

**Tabella 3.** *Percentuale di suini trattati con iniezioni per SRD*

	% Suini Trattati			% Ricadute		Giorni totali di trattamento
	Giorni 0-5	Giorni 5-30	0-Macello	Singola	Ripetute	
<b>T1-DRAXXIN</b>	0	31.48	35.69	10.51	3.51	8.39
<b>T2-AMOXI</b>	0	39.59	53.61	30.81	14.28	7.88
<i>SEM</i>	-	13.34	10.34	8.96	4.59	0.72
<i>P TREAT</i>	1.0	0.537	0.081	0.0005	0.0300	0.407

**Figura 1.** *Percentuale di suini in ogni categoria<sup>1</sup> di Lesioni polmonari (sx) e Pleuriti (dx).*



<sup>1</sup>La categoria dipende dalla %l di polmone o area della carcassa con lesioni (o pleura): 0= <10% area; 1= 10-30% area; 2= 30-60% area and 3= >60% area.

# USO METAFILATTICO DI DRAXXIN® CONTRO L'ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE (APP) IN FORMA CLINICA IN SUINI DA INGRASSO: CONFRONTO CON USO DI OSSITETRACICLINA NELL'ALIMENTO

## METAPHILACTIC USE OF DRAXXIN® AGAINST CLINICAL ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE (APP) IN FATTENING PIGS: COMPARISON WITH OXYTETRACYCLINE IN FEED

NANJIANI I.A.<sup>1</sup>, MORALES J.<sup>2</sup>, PIÑEIRO C.<sup>2</sup>, MANSO A.<sup>2</sup>, WUYTS N.<sup>3</sup>, BECCALOSSO M.<sup>4</sup>, DONCECCHI P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pfizer Ltd. VMRD, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, United Kingdom

<sup>2</sup>PigCHAMP Pro Europa S.A. C/Gremio de los Segovianos, 13, Pol. Ind. Hontoria, 40006 Segovia, Spain

<sup>3</sup>Pfizer Ltd. EUAFME, 23-25 avenue du Docteur Lannelongue F-75668 Paris Cedex 14, France

<sup>4</sup>Pfizer Animal Health Italia Srl, Via Valbondione 113, 00188 Roma, Italia

**Parole Chiave:** APP, Ingrasso, Metafilassi, Draxxin, Tulatromicina

**Keywords:** APP, Fattening Pigs, Metaphylaxis, Draxxin, Tulathromycin

**Riassunto.** Questo studio randomizzato, in cieco e a controllo positivo, è stato condotto per valutare l'efficacia della Tulatromicina (Draxxin®) come trattamento metafilattico verso *Actinobacillus Pleuropneumoniae* a fronte di un grave episodio acuto nella fase di ingrasso in un'azienda con una verificata storia clinica di APP, mediante il confronto di due gruppi trattati in metafilassi: uno trattato con Draxxin®, e un altro con ossitetraciclina nel mangime (OTC). Sono stati inclusi nello studio 320 suini divisi in 32 box e attraverso test di sensibilità antibiotica prima dell'inizio della prova si è verificata la sensibilità dei ceppi di APP all'ossitetraciclina. La valutazione è stata effettuata sulla base della risoluzione clinica e su parametri di performance. Nell'intero periodo di osservazione l'AMG nei box trattati con Draxxin® è stata più alta (779 vs 728 g/d; P=0.067) che nel gruppo OTC. Pochissimi suini trattati con Draxxin® hanno avuto bisogno di altri trattamenti contro l'SRD se confrontati con il gruppo OTC (28.8% vs 51.7%; P=0.014) e inoltre la percentuale dei suini trattati 3 o più volte per SRD è stata significativamente più alta nel gruppo OTC che nel gruppo Draxxin® (10.1% vs 2.6%; P=0.042). La mortalità riferibile ad APP non ha mostrato differenze tra i gruppi, ma numericamente è stata più bassa nel gruppo Draxxin® che nel gruppo OTC (2.2% vs 5.0%; P=0.397). Il trattamento con Draxxin® ha significativamente ridotto il numero dei giorni di occupazione dei box rispetto al gruppo OTC (184 vs 191; P0.006). I test di sensibilità antibiotica condotti sui ceppi di APP isolati durante lo studio hanno mostrato resistenza nei confronti dell'OTC, e a quel punto si è interrotta l'inclusione nello studio. L'utilizzo quindi di una singola iniezione di Tulatromicina come trattamento metafilattico per APP aumenta la sanità della popolazione trattata rispetto ad un approccio tradizionale di intervento. Questo programma di metafilassi presenta un uso responsabile e mirato di prodotti antimicrobici in caso di episodi acuti e gravi di APP.

**Abstract.** This randomised, blinded, positively controlled study was performed to assess the efficacy of Tulathromycin (Draxxin®) as a metaphylactic treatment against *Actinobacillus*

*pleuropneumoniae* (APP) in the face of a severe acute disease outbreak in the fattening period on a farm with an established history of APP, by comparison of two groups of piglets treated metaphylactically; one group with Draxxin®, and one group with in-feed oxytetracycline (OTC). A total 320 pigs allotted to 32 pens were used, and antimicrobial sensitivity testing at the start of the outbreak confirmed APP isolates were sensitive to oxytetracycline. Evaluation was based on the clinical resolution of APP and on performance parameters. Over the whole experimental period, ADG in the Draxxin pens tended to be higher (779 vs 728 g/d; P=0.067) than the oxytetracycline pens. Fewer pigs treated with Draxxin required subsequent antibiotic injections against SRD compared to the oxytetracycline group (28.8% vs 51.7%; P=0.014) and the proportion pigs treated 3 or more times against SRD was significantly higher in the Oxytetracycline group than in the Draxxin group (10.1% vs 2.6% respectively; P=0.042). Mortality related to APP did not differ between treatments, but was numerically lower in Draxxin than in Oxytetracycline pens (2.2% vs 5.0%; P=0.397). Draxxin treatment also significantly reduced the number of occupancy days by seven days compared to oxytetracycline treatment (184 vs 191; P=0.006). Antimicrobial sensitivity testing of App organisms isolated during the outbreak identified resistance to oxytetracycline, and enrolment stopped at that point. We conclude that the use of a single injection of tulathromycin as metaphylactic treatment for APP improved the health of the treated population when compared to a conventional in-feed intervention approach. Therefore this metaphylaxis program represents a responsible and targeted use of antimicrobial products in the face of a severe, acute APP outbreak.

## INTRODUZIONE

La malattia respiratoria nel suino (SRD) è una patologia complessa causata da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, e altri microrganismi patogeni, che può influenzare in modo importante le performance economiche e il benessere fisico degli animali colpiti.

La Tulatromicina, il componente attivo di Draxxin®, ha dimostrato tutta la sua efficacia contro le infezioni da *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* nei suini a seguito di una singola somministrazione. Draxxin® è registrato in via metafilattica per trattare l'SRD nel momento di insorgenza della patologia, è quindi possibile attendersi che un trattamento metafilattico somministrato a suini in accrescimento con sintomi iniziali di SRD, possa controllare l'infezione e possa avere un effetto benefico sulla loro crescita. Il tempo di attesa di Draxxin® è 33 giorni, tale trattamento dovrebbe essere quindi limitato nei primi 2/3 della fase di ingrasso.

La Tetraciclina è un antibiotico registrato per il controllo ed il trattamento delle patologie respiratorie dei suini, ed è disponibile in diverse formulazioni farmaceutiche come ad esempio premiscele, solubili o iniettabili. L'Ossitettraciclina sarà usata come controllo positivo nel presente studio.

Questo studio si pone l'obiettivo di indagare i benefici dell'uso di Draxxin® in metafilassi durante un grave e acuto episodio di APP in un allevamento con storicità di infezione nel periodo di magronaggio-ingrasso, attraverso il confronto di due gruppi di suini; un gruppo trattato metafilatticamente con Draxxin® ai primi sintomi della malattia, e un gruppo controllo trattato metafilatticamente con ossitettraciclina nel mangime nello stesso momento. La valutazione dei risultati è stata basata sull'incidenza di APP nei parametri di performance, come l'incremento di peso, le condizioni intercorrenti, l'uso di medicazioni e la mortalità, registrati dal giorno del trattamento (giorno 0) al giorno 30, e fino alla macellazione. Gli animali sentinella non hanno ricevuto trattamenti metafilattici e sono stati allevati negli stessi ambienti per dimostrare la presenza della malattia; all'insorgenza dei sintomi di malattia sono stati trattati con ossitettraciclina iniettabile.

## **MATERIALI E METODI**

La presenza dei patogeni target è provata da isolamenti batterici effettuati in polmoni di suini morti per patologia respiratoria prima dell'inizio dello studio, dalle lesioni polmonari accertate in macello, e da materiale diagnostico di casi clinici raccolto durante lo studio stesso. Sono stati usati un totale di 320 suini divisi in 32 box (10 suini per box). I suini sono stati divisi in 4 diverse stanze (8 box per stanza), e ogni stanza è stata inclusa nello studio in tempi diversi, quando circa il 20% dei suini della stanza stessa mostrava sintomi respiratori compatibili con APP e almeno il 75% dei box conteneva suini sintomatici (Giorno 0). Le diverse stanze sono state incluse nello studio in tempi diversi, una volta che si è dimostrata la presenza di sintomi clinici della malattia nella stanza stessa.

### **Progetto dello studio**

I 32 box sono stati destinati casualmente a: T01 – 14 box (140 suini) trattati metafilatticamente al giorno 0 (il giorno in cui la malattia ha raggiunto le soglie descritte) con Draxxin® in singola somministrazione a 2,5mg/kg di peso vivo; T02 - 14 box (140 suini), gruppo controllo positivo trattato metafilatticamente con ossitetraciclina nel mangime al Giorno 0 (30 mg/kg P.v. per 7 giorni); o a T03 - 4 box (40 suini), gruppo sentinella in cui i soggetti sono stati trattati individualmente con amoxicillina all'insorgere della sintomatologia respiratoria. Il trattamento metafilattico è iniziato quando almeno il 20% dei suini nella stanza ha mostrato sintomi respiratori compatibili con APP e almeno il 75% dei box conteneva suini con questi sintomi clinici (giorno 0), in modo che la presenza della malattia fosse confermata prima dell'inizio dello studio. Tutti i suini sono stati pesati al giorno 0 prima dei trattamenti, al giorno 7, 30 e il giorno prima della macellazione. Nel gruppo T01, il peso al giorno 0 è stato usato per determinare la corretta dose di Draxxin® da somministrare. Ogni suino (T01, T02 e T03) diagnosticato con SRD durante il periodo di osservazione è stato trattato con un trattamento standard: ossitetraciclina iniettabile, alla dose raccomandata, ripetuta dopo 48 ore se necessario.

### **Raccolta Dati**

Tutti i suini sono stati pesati al Giorno 0, al Giorno 7 dopo la somministrazione di ossitetraciclina nel mangime al gruppo T02, al giorno 30, e il giorno prima della macellazione per calcolare la resa della carcassa. Il consumo di alimento per box è stato registrato in modo costante, ed è stato usato per calcolare gli indici di conversione (Periodi: Giorno 0 – Giorno 7, Giorno 7 – Giorno 30 e Giorno 0 – Giorno 30). Gli animali sono stati osservati quotidianamente fino alla macellazione alla ricerca di sintomi di malattia, se necessario sottoposti a trattamento e il trattamento stesso documentato. Ogni suino morto o sottoposto ad eutanasia durante lo studio è stato sottoposto ad esame. In caso di decesso riferibile a SRD sono stati raccolti dei tamponi polmonari per identificare i patogeni responsabili.

### **Analisi Statistica e delle variabili**

I trattamenti sono stati somministrati sulla base dell'intero box, le variabili sono state quindi calcolate sulla base dei box (non su base individuale), e i valori dei box sommati e analizzati per trattamento.

I parametri usati per dimostrare l'efficacia della Metafilassi con Draxxin® nei confronti dell'SRD sono l'accrescimento medio giornaliero (AMG), l'ingestione media giornaliera (IMG) e l'indice di conversione dell'alimento (IC) tra il giorno 0 e il giorno 30; il numero di iniezioni per trattamenti, la mortalità relativa di ciascun gruppo, e i giorni di occupazione della stalla. L'analisi statistica è stata condotta usando un modello incrociato in SAS® version 9, assumendo l'effetto fisso del trattamento e l'effetto casuale della stanza.

## **RISULTATI**

Le analisi sierologiche hanno confermato un'alta esposizione ad APP (50% alla fine del

periodo di studio), a *Haemophilus parasuis* (78%) e a *Mycoplasma* (59%).

Gravi sintomi di malattia respiratoria sono stati osservati nelle quattro stanze di suini inclusi nello studio. Gli isolamenti di patogeni effettuati sui soggetti deceduti (tamponi polmonari da suini con SRD) comprendono soprattutto *Actinobacillus pleuropneumoniae*. I test di sensibilità antibiotica sugli isolati di APP all'inizio dello studio hanno confermato la sensibilità all'ossitetraciclina; senonchè altri ceppi di APP isolati durante lo studio hanno mostrato resistenza all'ossitetraciclina, e a quel punto si è interrotta l'inclusione nello studio.

**Parametri produttivi:** In confronto con il trattamento con ossitetraciclina, l'AMG del gruppo T01 è stato più alto (779 vs 728 g/d; P=0.067) che nel T02. Nell'intero periodo di osservazione il trattamento Draxxin® ha significativamente ridotto il numero di giorni di occupazione della stalla rispetto al gruppo ossitetraciclina (184 vs 191; P=0.006).

**Parametri riferiti a SRD:** il numero di suini che hanno avuto necessità di iniezioni antibiotiche per SRD (Tabella 3) è stato più basso nel gruppo T01 che nel gruppo T02 nei primi 25 giorni (26.8% vs 50.9%; P=0.007) e nell'intero periodo (28.8% vs 51.7%; P=0.014). La percentuale dei suini trattati 3 o più volte contro SRD è stata più alta nel gruppo ossitetra (10.1% vs 2.6%; P=0.042) che nel gruppo Draxxin®. La mortalità è stata principalmente causata da malattia legata ad APP, non ci sono state differenze tra T01 e T02, sebbene numericamente la mortalità legata ad APP sia stata più alta nel gruppo ossitetraciclina (2.2% vs 5.0%; P=0.39).

Nella valutazione delle lesioni polmonari al macello (Figura 1) il gruppo Draxxin® ha ridotto numericamente le lesioni polmonari e i punteggi di pleuriti rispetto al gruppo ossitetraciclina, sebbene queste differenze non siano state statisticamente significative.

## DISCUSSIONE

Garantire che ogni animale riceva la giusta dose di prodotto è fondamentale, ciò è favorito dall'immissione in commercio di diversi antibiotici a lunga azione e a largo spettro. Infatti, questi prodotti permettono il trattamento di un gruppo a rischio all'interno di una popolazione di suini, garantendo un dosaggio accurato e mirato sul singolo animale e il loro uso metafilattico è divenuto comune nella realtà di campo. L'efficacia sarà migliore se il prodotto scelto avrà una sufficiente durata di azione per coprire il periodo di attività della patologia attesa e un appropriato spettro di attività. La Tulatromicina è indicata per l'uso metafilattico in animali a rischio di sviluppare patologia nell'arco di 2 o 3 giorni, e dal suo utilizzo nel trattamento delle malattie respiratorie del magronaggio-ingrasso ci si possono attendere ottimi risultati. Nei primi studi, la metafilassi con Tulatromicina ha ridotto la morbilità riferita all'SRD e le conseguenti ricadute, se confrontata con trattamenti metafilattici nel mangime con utilizzo di Doxiciclina o Amoxicillina, e ha altresì aumentato i risultati economici del gruppo.

In questo studio è stato valutato l'utilizzo metafilattico di Draxxin® nel caso di un episodio acuto e grave di APP. La presenza di SRD è confermata dalle osservazioni cliniche e dagli isolamenti di patogeni respiratori (spt. *A. pleuropneumoniae*), e i risultati mostrano il valore di un approccio metafilattico con Tulatromicina che in questa azienda ha avuto un significativo miglioramento della risposta clinica, ridotto le necessità di ulteriori trattamenti antibiotici, sette giorni in meno di occupazione della stalla e una riduzione numerica delle lesioni polmonari al macello.

## CONCLUSIONI

Questo studio controllato e randomizzato condotto in condizioni di campo, ha permesso di dimostrare che l'utilizzo di una singola iniezione di Tulatromicina in caso di episodi acuti e gravi di APP nel magronaggio-ingrasso, permette di migliorare la sanità della popolazione trattata se confrontata con un convenzionale approccio "di intervento". Di conseguenza, questo programma di metafilassi mostra un uso responsabile e mirato di prodotti antimicrobici in aziende a rischio di sviluppare casi acuti e gravi di APP.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori riconoscono il supporto finanziario di Pfizer Animal Health che ha finanziato interamente questa ricerca. PigCHAMP Pro Europa collabora come consulente per Pfizer Animal Health in diversi progetti..

## BIBLIOGRAPHY

1. Palzer, A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. (2005) **Erregernachweis aus bronchoalveolärer Lavage bei Schweinen mit Atemwegserkrankungen.** *Tierärztliches Umschau*, **60**: 550-556.
2. Evans, N.A. (2005) **Tulathromycin: an overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease.** *Veterinary Therapeutics.*, **6** (2): 83-95.
3. McKelvie J, Morgan J, Nanjiani I, Sherington J, Rowan T, Sunderland S. (2005). **Evaluation of Tulathromycin for the treatment of pneumonia following experimental infection of swine with *Mycoplasma hyopneumoniae*.** *Veterinary Therapeutics.* 2005, **6** (2): 197-202.
4. Bradford, J and Nutsch, R. **Evaluation of tulathromycin injectable solution for the treatment of experimentally-induced *Mycoplasma pneumoniae* in pigs.** In *Proceedings of the Lemar Swine Conference: 15-18 September 2007.*
5. Nanjiani, I, McKelvie J, Benchaoui H, Godinho K, Sherington J, Sunderland S, Weatherley A, Rowan T. (2005) **Evaluation of the therapeutic activity of Tulathromycin against Swine Respiratory Disease on farms in Europe.** *Veterinary Therapeutics.* Vol. **6** (2): 203-213.
6. Pabst, T. (2005) **Wiederkehrende Atemwegsinfektionen beim Mastschwein Optimierung der Therapie mit Draxxin®.** *Grosstierpraxis.* 2007, **8** (5): 182-185.
7. Nutsch R, Hart F, Rooney K, Weigel D, Kilgore W, Skogerboe T. (2005) **Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring swine respiratory disease.** *Veterinary Therapeutics*, **6** (2): 214-225.
8. Allerson M, Deen J, Rutten S. **Efficacy of tulathromycin for the treatment of at risk nursery pigs.** In *Proceedings of American Association of Swine Veterinarians.* 2007, 71-72.
9. Toutain, P.L. **Role of PK/PD in Veterinary Drug Development.** *14th Biennial Symposium American Academy of Veterinary and Therapeutics - Veterinary Pharmacology Rockville USA.* 2005.
10. Bermúdez V, Tonelli T, Escalona M, Morales A. **A Field study to Evaluate Tulathromycin in Site II-III farm PRRS- and PCV2AD+ (PNDs) with a high mortality rate by *Mycoplasma, A. pleuropneumoniae* & *H. parasuis* in Venezuela.** In *Proceedings of the 20<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress: 22-26 June 2008,* P5.027.

**Tabella 1.** *Peso vivo, accrescimento medio giornaliero e giorni di occupazione*

	Giorni 0-7		Giorni 7-30		Giorni 0-Macellazione		
	PV7	AMG (g/d)	PV30	AMG (g/d)	PV Finale	AMG (g/d)	Giorni Occupazione
<b>T1-DRAXXIN</b>	39.7	754.5	53.1	570.7	102.4	779.4	184.2
<b>T2-OXYTETRA</b>	39.2	690.6	52.6	566.9	100.4	728.1	190.8
<b>SEM<sup>1</sup></b>	0.290	41.56	0.737	21.05	2.621	18.71	3.582
<b>P TREAT</b>	0.299	0.292	0.528	0.901	0.325	0.0672	0.0058

<sup>1</sup>Standard error of mean (n=18)

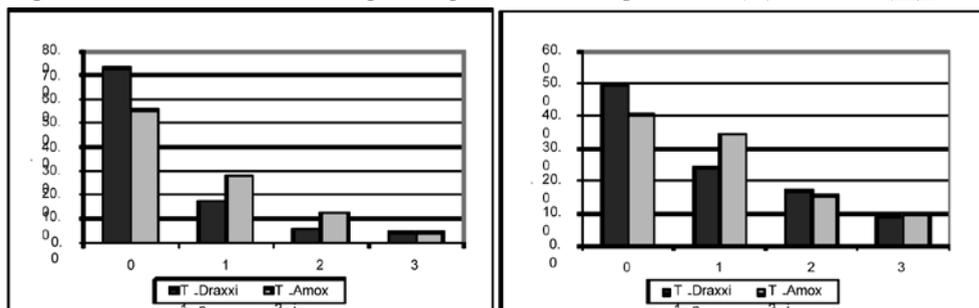
**Table 2.** *Ingestione media giornaliera e indice di conversione*

	Giorni 0-7		Giorni 7-30	
	IMG (g/d)	IC (g/g)	IMG (g/d)	IC (g/g)
<b>T1-DRAXXIN</b>	1462.1	1.981	1473.1	2.565
<b>T2-OXYTETRA</b>	1474.1	2.243	1503.9	2.738
<b>SEM</b>	64.72	0.170	15.67	0.130
<b>P TREAT</b>	0.881	0.230	0.611	0.314

**Table 3.** *Percentuale di suini trattati con iniezioni per SRD*

	% Suini trattati			% Ricadute		Giorni totali di trattamento
	0-7 Giorni	7-30 Giorni	0-Macello	Singola	Ripetute	
<b>T1-DRAXXIN</b>	0	26.78	28.78	14.91	2.57	8.35
<b>T2-OXYTETR</b>	0	50.98	51.66	27.46	10.06	9.56
<b>SEM</b>	-	12.66	13.15	8.91	2.61	0.67
<b>P TREAT</b>	1.0	0.0075	0.0142	0.1488	0.0423	0.456

**Figura 1.** *Percentuale di suini in ogni categoria<sup>1</sup> di Lesioni polmonari (sx) e Pleuriti (dx).*



<sup>1</sup>La categoria dipende dalla %l di polmone o area della carcassa con lesioni (o pleura): 0= <10% area; 1= 10-30% area; 2= 30-60% area and 3= >60% area.

# VALUTAZIONE SIEROLOGICA DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO ANTI-PCV2

## SEROLOGICAL EVALUATION OF A VACCINE AGAINST PCV2

OSTANELLO F.<sup>1</sup>, GRANITO G.<sup>2</sup>, RUGNA G.<sup>3</sup>, LELLI D.<sup>3</sup>, LEOTTI G.<sup>4</sup>,  
MERIALDI G.<sup>3</sup>, BIANCHI M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna; <sup>2</sup> Veterinario libero professionista; <sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna; <sup>4</sup> Merial Italia

**Parole chiave:** Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2), vaccinazione, sierologia, suinetti  
**Key words:** Porcine Circovirus type 2 (PCV2), vaccination, serology, piglets

**Riassunto.** La prova è stata condotta per valutare l'efficacia sierologica di un vaccino anti PCV2 in un allevamento con anamnesi positiva per PMWS. In due gruppi di scrofe (vaccinate e non vaccinate), sono stati valutati i titoli anticorpali pre-vaccinazione (6 settimane dal parto) e quelli presenti 10 giorni dopo il parto. Analogamente, su un campione di suinetti nati sia da scrofe vaccinate sia da scrofe non vaccinate, è stato determinato il titolo anticorpale anti PCV2 a 10 e a 20 giorni di vita. Per la valutazione sierologica sono state utilizzate due diverse metodiche immunoenzimatiche. Nelle scrofe vaccinate, il titolo anticorpale a 10 giorni dopo il parto è risultato significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo. Anche i titoli anticorpali nei suinetti nati da madri vaccinate hanno messo in evidenza un'analogia differenza sia a 10 che a 20 giorni di vita.

**Summary.** The trial was performed to evaluate the serological efficacy of a vaccine against PCV2 in a herd with a history of PMWS. In two groups of sows (vaccinated and unvaccinated) antibody titers pre-vaccination (6 weeks before delivery) were compared with those at 10 days postpartum. Similarly, the antibody titers were determined at 10 and 20 days of age in a sample of piglets born from both vaccinated and unvaccinated sows. For the serological evaluation two different ELISA methods were using. In vaccinated sows, the antibody titer 10 days after delivery was significantly higher than that of the control group. Also the antibody level in piglets born from vaccinated sows showed a similar difference at 10 and 20 days of life.

### INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus a DNA a singolo filamento circolare, appartenente alla famiglia *Circoviridae*. PCV2 è ritenuto il principale responsabile di numerose patologie, attualmente definite come porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) in nord America o porcine circovirus diseases (PCVD) in Europa (Gillespie e coll., 2009; Grau-Roma e coll., 2011). Oltre alla *Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS), ora denominata, in nord America, *PCV2-associated systemic infection* (Opriessnig e coll., 2007), anche la *Dermatitis and Nephropathy Syndrome* (PDNS), alcune sindromi respiratorie, patologie enteriche, disordini riproduttivi su base individuale o di allevamento, sono comprese nella definizione PCVD/PCVAD. La prevalenza delle PCVD ha subito un progressivo aumento nell'ultimo decennio, in particolare negli allevamenti di grandi dimensioni, rappresentando oggi una delle patologie con il più elevato impatto economico nell'industria suinicola mondiale (Gillespie e coll., 2009).

Ancora oggi, la parte più significativa delle manifestazioni patologiche associate all'infezione da PCV2 è rappresentata dalla PMWS (Gillespie e coll., 2009). La PMWS interessa principalmente i suinetti tra le 7 e le 12 settimane di vita, causando mediamente una mortalità pari al 10% e una riduzione sensibile degli indici di accrescimento. PCV2 è un virus ubiquitario nella popolazione suina ed è presente sia in allevamenti colpiti da PMWS sia in allevamenti non affetti dalla sindrome. La presenza di PCV2 è quindi necessaria ma non sufficiente per determinare la malattia che può essere considerata una patologia condizionata (Kekarainen e coll., 2010). I fattori condizionanti fino ad oggi individuati sono numerosi e possono essere di natura ambientale, microbiologica, genetica, manageriale, immunitaria. Questi fattori agiscono secondo combinazioni diverse in funzione della specifica azienda e rendono estremamente difficile la riproduzione sperimentale della malattia. Occorre inoltre sottolineare due ulteriori aspetti delle patologie associate a PCV2. Il primo è quello relativo al fatto che è stato dimostrato che l'infezione da PCV2, anche in assenza di sintomatologia clinica, agisce negativamente sulle performances produttive dei suini in fase di accrescimento (Ostanello e coll., 2005; Lyoo e coll., 2010); il secondo punto riguarda il ruolo che ha l'immunità nel ridurre l'espressione patogena di PCV2 e la quantità di virus eliminato nell'ambiente dai soggetti infetti (Opriessnig e coll., 2009; Opriessnig e coll., 2010; Grau-Roma e coll., 2011). L'osservazione che in condizioni sperimentali è possibile infettare suinetti che presentano elevati titoli anticorpali (Ostanello e coll., 2005; Ford e coll., 2009) ma che in questi animali l'incremento ponderale è migliore rispetto a soggetti con titoli anticorpali inferiori (Ostanello e coll., 2005; Opriessnig e coll., 2010), dimostra che l'immunità (attiva o passiva) gioca un ruolo importante in termini di prevenzione del danno zootecnico e apre interessanti prospettive nell'utilizzo di vaccini anti-PCV2 non solo nelle aziende con problemi clinici da PMWS, ma anche negli allevamenti con anamnesi negativa per PMWS.

Il presente lavoro ha avuto come scopi principali: a) valutare, in condizioni di campo, la risposta anticorpale anti-PCV2 in scrofe vaccinate rispetto ad un gruppo di controllo costituito da scrofe non vaccinate; b) valutare eventuali differenze dei titoli anticorpali anti PCV2 in suinetti nati da scrofe vaccinate rispetto ad un gruppo di suinetti di controllo nati da madri non vaccinate. E' stato inoltre condotto un confronto tra i risultati ottenuti utilizzando due diverse metodiche immunoenzimatiche: 1) test ELISA messo a punto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), routinariamente utilizzato in Italia per la diagnosi sierologica dell'infezione da PCV2 e, b) test ELISA commerciale (SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France), frequentemente utilizzato in altri Paesi europei. Tale confronto è stato eseguito anche con lo scopo di fornire al medico veterinario alcune indicazioni utili alla comparazione dei risultati ottenuti impiegando il primo dei due test, con alcune delle informazioni presenti in letteratura.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Azienda***

La prova sperimentale è stata condotta nel periodo agosto-ottobre 2010. L'allevamento, a ciclo aperto e con rimonta interna, era costituito da circa 1500 scrofe produttive (Large White e Large White x Landrace). I soggetti svezzati destinati all'ingrasso vengono trasferiti in strutture separate rispetto al nucleo riproduttivo aziendale. L'anamnesi di allevamento riporta una condizione di stabilità dell'infezione da PRRSV e la circolazione di virus influenzali (SIV), *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Le scrofe erano vaccinate nei confronti del Parvovirus suino (PPV), virus della Malattia di Aujeszky, mal rosso, SIV e PRRSV.

Nell'azienda era stata effettuata la diagnosi della presenza di PMWS mediante esame istopatologico ed immunoistochimico e quantificazione della presenza di PCV2 nelle lesioni (Sarli e coll., 2009). Prima dell'inizio della prova, non era mai stato impiegato, per le scrofe, un vaccino anti PCV2.

### ***Animali in sperimentazione***

La prova è stata condotta su 23 animali fecondati nella medesima settimana e selezionati in modo da essere rappresentativi, per numero di parto e caratteristiche genetiche, delle scrofe presenti in azienda. Le scrofe sono state identificate singolarmente mediante registrazione del numero aziendale riportato sulla marca auricolare e divise in modo casuale in due gruppi (gruppo A: 11 scrofe; gruppo B: 12 scrofe). I soggetti del gruppo A sono stati vaccinati, secondo le indicazioni del produttore, inoculando una prima dose da 2 ml per via intramuscolare profonda nella regione retroauricolare, 6 settimane prima del parto e una seconda dose 3 settimane dopo. Il prodotto utilizzato è un vaccino inattivato contenente Circovirus suino tipo 2 (CIRCOVAC<sup>®</sup>, Merial, Lyon, France), adiuvato con paraffina liquida leggera. I soggetti del gruppo B sono stati mantenuti come controlli non vaccinati. Al momento della prima somministrazione del vaccino (giorno 0) e 10 giorni dopo il parto, è stato prelevato un campione di sangue da tutti i soggetti in sperimentazione.

Per ogni nidata è stato selezionato in maniera casuale un campione costituito mediamente da 3 soggetti (gruppo C, suinetti nati da scrofe vaccinate: 30 animali; gruppo D, suinetti nati da scrofe non vaccinate: 34 soggetti). Da questi animali è stato effettuato un prelievo ematico a 10 e a 20 giorni di vita. Tutti gli animali in sperimentazione (scrofe e relativi suinetti) sono stati stabulati negli stessi locali.

### ***Valutazione sierologica***

La quantificazione degli anticorpi anti PCV2 è stata effettuata con due metodiche immunoenzimatiche. I sieri sono stati esaminati con una metodica ELISA di tipo competitivo messa a punto dall'IZSLER (Sala e coll., 2000) e con un kit commerciale, sempre di tipo competitivo (SERELISA<sup>®</sup> PCV2 Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon).

### ***Analisi statistica***

Preliminarmente, è stata valutata la normalità della distribuzione campionaria dei dati quantitativi utilizzando il test di Kolmogoro-Smirnoff. Sulla base dei risultati di questo test, sono state realizzate le seguenti analisi, utilizzando sia i risultati forniti dal test ELISA-IZSLER sia quelli forniti dal test ELISA-Symbiotics: a) confronto, mediante test *t* di Student, della media dei titoli anticorpali anti PCV2 pre-vaccinali (t0) e a 10 giorni dal parto (t1) nelle scrofe dei due gruppi); b) confronto, mediante test *t* di Student per dati appaiati, della variazione dei titoli anticorpali anti PCV2 tra t0 e t1 nelle scrofe dei 2 gruppi.

Per quanto riguarda i suinetti, sono state realizzate le seguenti analisi utilizzando sia i risultati forniti dal test ELISA-IZSLER sia quelli forniti dal test ELISA-Symbiotics: c) confronto, mediante test *t* di Student, della media dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 giorni di vita (t10) e a 20 giorni di vita (t20) nei suinetti nati dalle scrofe dei due gruppi; d) confronto, mediante test *t* di Student per dati appaiati, della variazione dei titoli anticorpali anti PCV2 tra t10 e t20 nei soggetti nati da madri vaccinate e non vaccinate.

E' stato inoltre valutato il grado di correlazione tra i risultati forniti dai due test calcolando il coefficiente parametrico di correlazione (*r* di Pearson) o l'equivalente non parametrico (*rho* di Spearman).

Tutte le analisi sono state condotte utilizzando SPSS 12.0, previa trasformazione logaritmica ( $\log_{10}$ ) dei risultati sierologici.

## **RISULTATI**

### ***Scrofe***

Prima della somministrazione del vaccino (t0), tutte le scrofe erano sieropositive per PCV2 e la media dei titoli anticorpali rilevati sia con la metodica ELISA-IZSLER sia con il kit commerciale (tab. 1) non era significativamente diversa nei due gruppi di scrofe in sperimentazione (rispettivamente:  $t=-1,12$   $p=0,275$  e  $t=-0,47$   $p=0,64$ ).

**Tabella 1.** Media del  $\log_{10}$  dei titoli anticorpali anti PCV2 pre- e post- vaccinazione valutati con 2 diverse metodiche ELISA nelle scrofe in sperimentazione

**Table 1.** Mean antibody titres ( $\log_{10}$ ) against PCV2 pre-and post-vaccination, evaluated with two different ELISA methods in sows

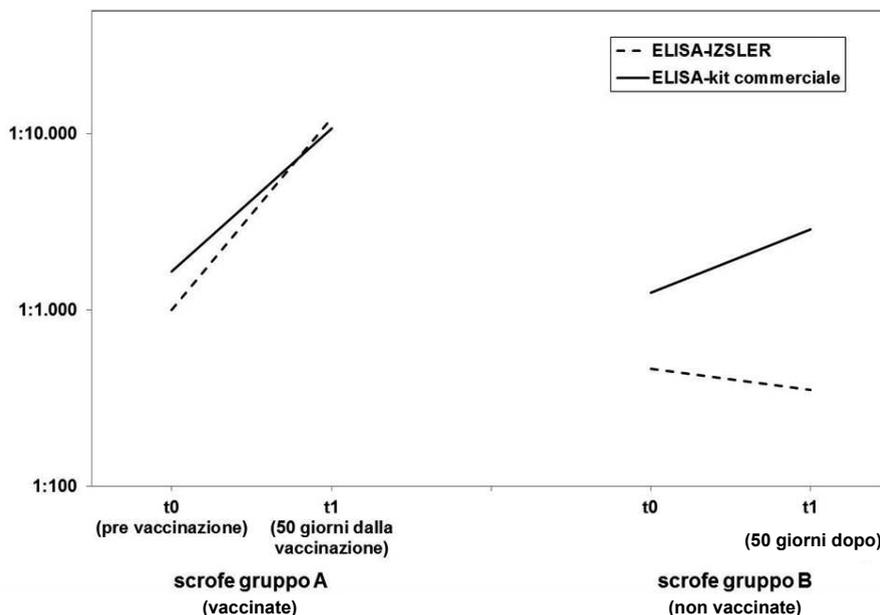
Metodica ELISA	Prelievo	Media ( $\log_{10}$ ) $\pm$ dev.std. del titolo anticorpale anti PCV2	
		gruppo A	gruppo B
ELISA-IZSLER	t0	3,00 $\pm$ 0,77	2,67 $\pm$ 0,65
	t1	4,09 $\pm$ 0,70	2,55 $\pm$ 0,52
ELISA- Synbiotics	t0	3,22 $\pm$ 0,57	3,10 $\pm$ 0,64
	t1	4,03 $\pm$ 0,28	3,46 $\pm$ 0,17

A 10 giorni dal parto (t1), cioè circa 50 giorni dopo la somministrazione della prima dose vaccinale, la media dei titoli anticorpali anti PCV2 rilevata utilizzando sia la metodica ELISA-IZSLER sia il kit commerciale è significativamente più elevata nel gruppo delle scrofe vaccinate (gruppo A) rispetto a quella del gruppo di controllo (gruppo B), (rispettivamente: ( $t$  test=-5,866;  $p$ <0,000 e ( $t$  test=-5,878;  $p$ <0,000).

Relativamente alla variazione dei titoli anticorpali tra i due prelievi (fig. 1), nel gruppo A è stato evidenziato un aumento statisticamente significativo dei valori, sia utilizzando la metodica ELISA-IZSLER (paired samples  $t$  test=-3,833;  $p$ =0,003), sia il kit commerciale (paired samples  $t$  test=-4,868;  $p$ =0,001).

**Figura 1.** Andamento dei titoli anticorpali anti PCV2 pre- e post- vaccinazione valutati con 2 diverse metodiche ELISA nelle scrofe in sperimentazione

**Figure 1.** Changes in antibody titers against PCV2 pre-and post-vaccination (10 days after delivery) evaluated with two different ELISA methods in sows



Nel gruppo B, non è stata messa in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa tra i due prelievi quando vengono utilizzati i valori forniti dalla metodica ELISA-IZSLER (paired samples *t* test=0,43; *p*=0,676), mentre viene evidenziato un aumento dei titoli anticorpali, ai limiti della significatività statistica, quando vengono utilizzati i valori ottenuti dal kit commerciale (paired samples *t* test=-2,335; *p*=0,040).

### **Suinetti**

A 10 giorni di vita la media dei titoli anticorpali anti-PCV2 nei gruppi di suinetti nati da madri vaccinate è significativamente più elevata rispetto a quella degli animali nati dalle scrofe di controllo (metodica ELISA-IZSLER: *U* di Mann-Whitney=124; *p*<0,000 e kit commerciale: *U* di Mann-Whitney=8; *p*<0,000).

Anche a 20 giorni di vita, la media dei titoli anticorpali anti-PCV2 nei suinetti nati da madri vaccinate è significativamente più elevata rispetto a quella degli animali nati dalle scrofe di controllo (metodica ELISA-IZSLER: *U* di Mann-Whitney=116; *p*<0,000 e kit commerciale: *U* di Mann-Whitney=2; *p*<0,000). Inoltre, i titoli anticorpali sono più omogenei (tab. 2).

**Tabella 2.** Media del  $\log_{10}$  dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 e 20 giorni di vita dei suinetti nati da madri vaccinate e non vaccinate, valutati con 2 diverse metodiche ELISA

**Table 2.** Mean antibody titers ( $\log_{10}$ ) against PCV2 in 10 and 20 days old piglets born from vaccinated and unvaccinated sows, assessed with two different ELISA methods

Metodica ELISA	giorni di vita	Media ( $\log_{10}$ ) $\pm$ dev.std. del titolo anticorpale anti PCV2	
		nati da madri vaccinate	nati da madri non vaccinate
ELISA-IZSLER	10	4,40 $\pm$ 0,62	3,03 $\pm$ 0,87
	20	3,50 $\pm$ 0,63	2,35 $\pm$ 0,85
ELISA- Synbiotics	10	4,11 $\pm$ 0,09	3,44 $\pm$ 0,40
	20	3,98 $\pm$ 0,16	3,32 $\pm$ 0,40

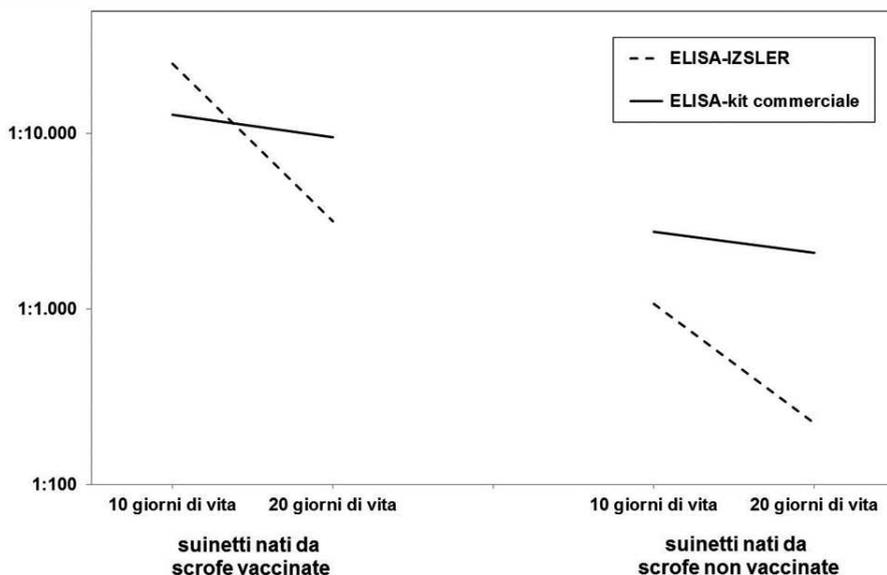
Tra i 10 e i 20 giorni di vita (fig. 2), si osserva, complessivamente, una diminuzione dei titoli anticorpali nei soggetti dei 2 gruppi. In particolare, nei soggetti nati da madri vaccinate tale decremento risulta statisticamente significativo sia utilizzando i risultati del test ELISA-IZSLER (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-4,508; *p*<0,000), sia utilizzando i risultati del kit commerciale (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-3,543; *p*<0,000).

Nei suinetti nati da scrofe non vaccinate, la riduzione dei titoli anticorpali risulta statisticamente significativa quando vengono valutati i risultati del test ELISA-IZSLER (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-3,491; *p*<0,000), ma non quando vengono utilizzati i risultati del kit commerciale (Wilcoxon Signed Ranks *Z*=-1,283; *p*=0,200).

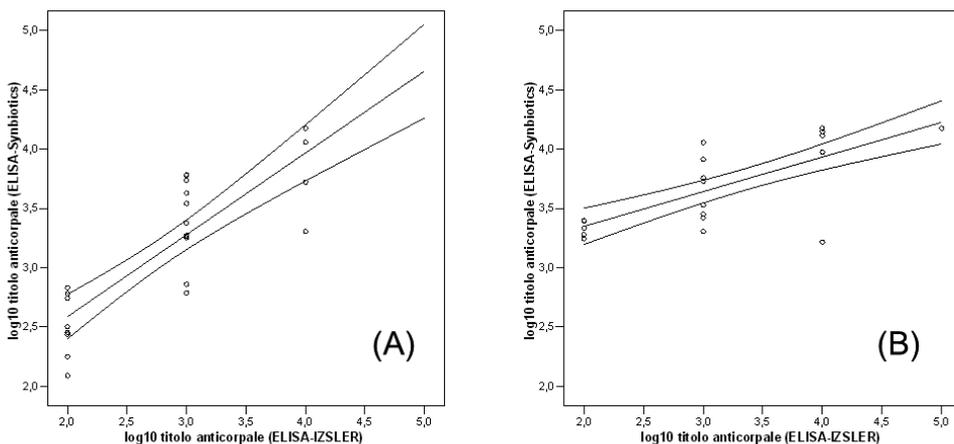
### **Correlazione tra i risultati dei 2 test ELISA**

Tutti i sieri esaminati sono risultati positivi ad entrambe le metodiche. I risultati quantitativi mostrano valori di correlazione altamente significativi sia nella valutazione effettuata sul siero delle scrofe prima della somministrazione del vaccino (fig. 3a), sia in quella effettuata a 10 giorni dal parto (fig. 3b), (rispettivamente: *r*=0,831; *p*<0,01 e *r*=0,770; *p*<0,01).

**Figura 2.** Andamento dei titoli anticorpali anti PCV2 a 10 e 20 giorni di vita nei suinetti nati da madri vaccinate e non vaccinate, valutati con 2 diverse metodiche ELISA  
**Figure 2.** Changes in antibody titers against PCV2 in 10 and 20 days old piglets born from vaccinated and unvaccinated sows, assessed with two different ELISA methods



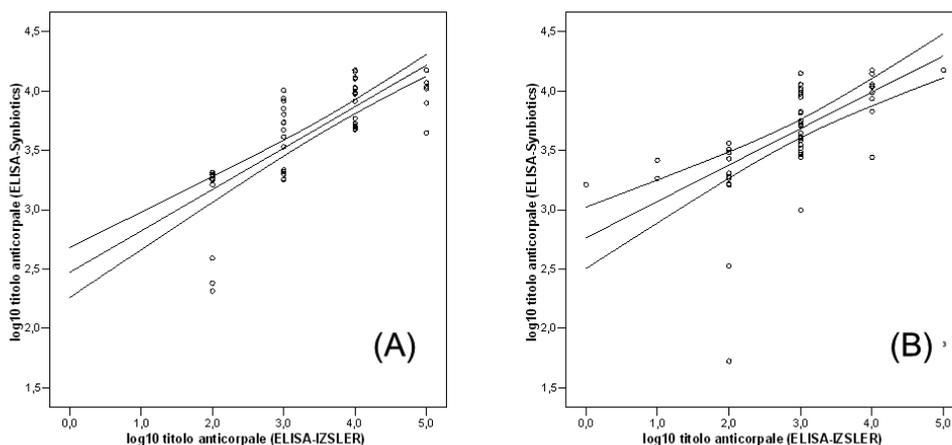
**Figura 3.** Regressione dei titoli anticorpali anti-PCV2 ( $\log_{10}$ ) misurati prima della vaccinazione (A) e 10 giorni dopo il parto (B) nei due gruppi di scrofe. I punti nel grafico evidenziano le corrispondenze tra i titoli sierologici ottenuti con il test ELISA-IZSLER e quelli forniti dal kit commerciale.  
**Figure 3.** Linear regression of anti-PCV2 antibody titers ( $\log_{10}$ ) measured before vaccination (A) and 10 days after the delivery (B) in both groups of sows. The points on the graph show the correspondences between the titles obtained by the ELISA-IZSLER method and those obtained with the ELISA commercial method.



Analogamente, anche l'esame dei sieri dei suinetti a 10 (fig. 4a) e a 20 giorni di vita (fig. 4b) mostra valori di correlazione altamente significativi tra i risultati ottenuti con i due test ELISA (rispettivamente:  $\rho$  di Spearman=0,817;  $p<0,01$  e  $\rho$  di Spearman =0,780;  $p<0,01$ ).

**Figura 4.** Regressione dei titoli anticorpali anti-PCV2 (log10) misurati a 10 giorni di vita (A) e 20 giorni di vita (B) nei due gruppi di suinetti. I punti nel grafico evidenziano le corrispondenze tra i titoli sierologici ottenuti con il test ELISA-IZSLER e quelli forniti dal kit commerciale.

**Figure 4.** Linear regression of anti-PCV2 antibody titers (log10) measured at 10 (A) and 20 (B) days of life in both groups of piglets. The points on the graph show the correspondences between the titles obtained by the ELISA-IZSLER method and those obtained with the ELISA commercial method.



## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione confermano l'efficacia della vaccinazione anti PCV2 in termini di stimolazione dell'immunità attiva anche in scrofe con elevati titoli anticorpali. Il valore medio dei titoli anticorpali delle scrofe vaccinate (gruppo A), misurato 10 giorni dopo il parto, è significativamente più elevato rispetto a quello di scrofe di controllo non vaccinate. Tale differenza è particolarmente significativa se si considera che i due interventi vaccinali effettuati sulle scrofe del gruppo A rappresentano esclusivamente l'immunizzazione di base. Verosimilmente, i richiami vaccinali, eseguiti nel corso delle gravidanze successive, potrebbero contribuire ad far aumentare ulteriormente i titoli anticorpali anti PCV2.

L'efficacia immunitaria della vaccinazione è confermata inoltre dalle valutazioni eseguite sui suinetti. Gli animali nati da madri vaccinate presentano valori medi di titoli anticorpali specifici per PCV2 significativamente più elevati rispetto a suinetti nati da scrofe non vaccinate, sia a 10 sia a 20 giorni di vita. Questa osservazione conferma quanto riportato da altri Autori che hanno dimostrato una correlazione positiva tra i titoli anticorpali materni e immunità passiva dei suinetti (Baysinger e coll., 2010). Evidenze sperimentali (McKeown et al., 2005) hanno dimostrato che elevati titoli anticorpali passivi riducono le probabilità di infezione nei soggetti esposti e la quantità di virus che è possibile mettere in evidenza nel siero, al contrario di quanto accade in soggetti con bassi titoli anticorpali. Inoltre, quantità superiori di anticorpi specifici anti PCV2 di origine materna, garantiscono una maggiore durata dell'immunità (Sidler e coll., 2010). E' stato anche dimostrato (Opriessnig e coll., 2010) come l'immunizzazione passiva o attiva dei suinetti abbia una efficacia paragonabile in

termini di riduzione dell'escrezione di PCV2 e della quantità di virus presente nei suinetti. Nelle scrofe non vaccinate, il titolo anticorpale anti PCV2, determinato utilizzando il test ELISA-IZSLER, pur riducendosi leggermente, non differisce in maniera significativa nei due momenti (t0: 2,67; t1: 2,55). Al contrario, i risultati del test ELISA-Symbiotics mettono in evidenza un incremento, ai limiti della significatività statistica, dei titoli anticorpali tra t0 e t1 (rispettivamente: 3,10 e 3,46)

In entrambi i gruppi di suinetti, i titoli anticorpali tendono a ridursi nel tempo e, nei soggetti nati da scrofe vaccinate, tale decremento risulta statisticamente significativo utilizzando i risultati forniti da entrambi i test ELISA. Nei suinetti nati da madri non vaccinate, la riduzione dei titoli anticorpali nel tempo risulta statisticamente significativa quando vengono valutati i risultati del test ELISA-IZSLER, ma non quando vengono utilizzati i risultati del kit commerciale.

Considerando che le due metodiche ELISA sono tra loro molto simili, sia in termini di schema di reazione sia per quanto riguarda l'antigene utilizzato e che la valutazione complessiva dei risultati forniti nelle diverse categorie di soggetti e nei diversi momenti considerati dimostra una forte correlazione, risulta difficile avanzare delle ipotesi che giustifichino le discordanze evidenziate.

### **Bibliografia**

1. Baysinger A., Diaz E., Edler R. (2010). Profile and agreement of dam and piglet PCV2 IFA titers. Proc. 21st IPVS Congress, 307.
2. Fort M., Sibila M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Mateu E., Segalés J. (2009). 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, 4031-4037.
3. Gillespie J., Opriessnig T., Meng X.J., Pelzer K., Buechner-Maxwell V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 23, 1151-1163.
4. Grau-Roma L., Fraile L., Segalés J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.*, 187, 23-32.
5. Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J., Allan G.M. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136, 185-193.
6. Lyoo K, Joo H, Caldwell B, Kim H, Davies PR, Torrison J. (2010). Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *Vet J.*, in press.
7. McKeown N.E., Opriessnig T., Thomas P., Guenette D.K., Elvinger F., Fenaux M., Halbur P.G., Meng X.J. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 1347-1351.
8. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591-615.
9. Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Halbur P.G. (2009). 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, 1002-1007.
10. Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X.J., Halbur P.G. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet. Microbiol.*, 142, 177-183.

11. Ostanello F., Caprioli A., Di Francesco A., Battilani M., Sala G., Sarli G., Mandrioli L., McNeilly F., Allan G.M., Prosperi S. (2005). Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, 108, 179-186.
12. 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. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy.
13. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009). Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Vet. Rec.* 164, 519-523.
14. Sidler X., Kurmann J., Buergi E., Brugnera E., Sydler T. (2010). Induction of maternal antibodies and the effect on growth parameters by Circovac® in a field study. Proceedings of the 21<sup>st</sup> IPVS Congress, 418.

# PROFILO SIEROLOGICO E VIROLOGICO DELL'INFEZIONE DA PCV2 E PRRSV IN 10 ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI

## SEROLOGIC AND VIROLOGIC PROFILE OF PCV2 AND PRRSV INFECTIONS IN 10 ITALIAN SWINE HERDS

PAVESI R.<sup>1</sup>, CEVIDALLI A.<sup>2</sup>, BLANCHAERT A.<sup>2</sup>, COMINOTTI F.<sup>2</sup>,  
NASSUATO C.<sup>1</sup>, BONIOTTI B.<sup>1</sup>, ALBORALI L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia  
<sup>2</sup> Intervet Schering-Plough Animal Health, Segrate, Milano .

**Parole chiave:** PCV2, PRRSV, Anticorpi, PCR

**Key Words:** PCV2, PRRSV, Antibodies, PCR

**Riassunto:** L'obiettivo di questa indagine diagnostica è quello di valutare il profilo sierologico e virologico dell'infezione da PRRSV e PCV2 in allevamenti italiani a ciclo chiuso e multisito. Sono state individuate 10 aziende, che non praticavano vaccinazione verso PRRSV e PCV2 e che presentavano comunque problematiche riconducibili a questi patogeni. In ogni azienda sono stati selezionati casualmente 5 o 10 suini per ogni categoria di età corrispondente a 1- 3/4- 8- 12- 16- 20- 24 settimane di vita. Per ogni azienda sono stati prelevati 35 o 70 campioni di sieri. Tutte le aziende sono risultate positive per PCV2 e 9 per PRRSV, a conferma dell'ampia diffusione di tali infezioni. La sieropositività dei suini è risultata elevata: il 74,9% degli animali presentano anticorpi anti-PCV2 e il 73,3% anticorpi anti-PRRSV. L'infezione da PCV2 è risultata essere più tardiva rispetto a quella da PRRSV. Nel 70% degli allevamenti la circolazione di PCV2 è stata evidenziata oltre le 16 settimane di età. È stata confermata la maggior precocità dell'infezione da PRRSV: nell'80% degli allevamenti la viremia da PRRSV si è verificata nel post svezzamento prima delle 8 settimane di età. La valutazione del profilo sierologico e virologico di queste infezioni consente di individuare l'età di esordio della malattia la durata dell'infezione e le categorie di suini interessate. La conoscenza di questi dati è importante sia al fine diagnostico sia per la programmazione degli interventi vaccinali.

**Abstract:** The aim of this diagnostic investigation is defining the serologic and virologic pattern of PCV2 and PRRSV in Italian closed cycle and multisite farms. 10 farms, without PCV2 and PRRSV vaccination interferences, with problems related to these viral pathogens, have been selected. In each farm 5 or 10 pigs have been randomly selected for each age category of 1- 3/4- 8- 12- 16- 20- 24 weeks. For each farm have been sampled 35 or 70 serums. Every farms were The results showed that all farms are positive for PCV2 and only 9 also for PRRSV, this confirms the wide spread of PRRSV and PCV2 infection. Confirmation is also considering the number of pigs seropositive, 74,9% of the animals have antibodies to PCV2 and 73,3% of the animals have antibodies to PRRSV. Data show that the PCV2 infection occurs late, in fact in 70% of the farms viral circulation is highlighted beyond 16 weeks of age. Is confirmed that infection with PRRSV is early, in the 80% of herds infection with PRRSV occurs before 8 weeks of age, in post-weaning. For the control of these viral diseases is important to assess, based on continuously updated data, age of onset, or the categories of those affected, and duration of viremia in order to plan interventions targeted according to each individual farm.

## INTRODUZIONE

Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) è un virus a DNA che appartiene alla famiglia *Circoviridae* genere *Circovirus*, mentre Porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) è un virus a RNA che appartiene alla famiglia *Arteriviridae* genere *Arterivirus*. Per il settore suinicolo PCV2 e PRRSV rappresentano, ad oggi, un grave problema sanitario-economico. PCV2 è associato a diverse condizioni patologiche note come Porcine Circovirus Diseases (PCVD), tra cui la più nota è la sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS) che colpisce soggetti di età compresa tra i 2 e i 4 mesi di età (Segales et al. 2002, Allan et al. 2000, Opriessning et al. 2007). La PMWS, come le altre PCVD, è una patologia ad eziologia multifattoriale, dove l'infezione da PCV2 è una condizione necessaria per la comparsa di manifestazioni cliniche e la gravità è correlata a fattori ambientali e gestionali. Tra i possibili fattori implicati nell'evoluzione patogenetica dell'infezione da PCV2, ruolo determinante sembra essere svolto dalla co-infezione con PRRSV (Rose et al. 2003). PRRSV è l'agente responsabile di una sindrome caratterizzata da turbe riproduttive nella scrofa e da forme respiratorie e mortalità (Albina et al., 1994; Houben et al., 1995). Sono diversi gli studi in cui è stata evidenziata una maggiore prevalenza dei casi di PMWS nelle aziende PRRSV positive e segni clinici più severi nei suini infettati da entrambi i patogeni (Allan et al., 2000, Harms et al., 2001, Rovira et al. 2002, Rose et al. 2003). La conoscenza della dinamica dell'infezioni da PCV2-PRRSV all'interno dell'allevamento è fondamentale per la pianificazione di un'efficace strategia di controllo. Obiettivo del lavoro è valutare l'andamento delle infezioni da PCV2 e PRRSV tramite test diagnostici di routine, al fine di ottenere profili sierologici e virologici, che consentirebbero un approccio mirato e adeguato all'evoluzione delle malattie.

## MATERIALI E METODI

### Protocollo di campionamento

È stato applicato un modello di campionamento di tipo cross-sectional in grado di rilevare dati in un determinato momento corrispondente al tempo in cui viene effettuata la rilevazione. Sono state individuate 10 aziende del Nord Italia che nella loro anamnesi remota presentavano problematiche riconducibili a PCV2 e/o a PRRSV, ma che non effettuavano vaccinazioni nei confronti di questi 2 patogeni. Sono state coinvolte 7 aziende multisede e 3 aziende a ciclo chiuso. Negli allevamenti italiani il 79,9% dei soggetti è risultato positivo per PCV2 (Sarli et al. 2009). In base a questo, con una prevalenza attesa di almeno il 50%, un campionamento di almeno 5 suini è sufficiente ad identificare un allevamento come PCV2 infetto o no, con un livello di confidenza del 90%. Pertanto, per ogni azienda sono stati individuati 5-10 soggetti di 1- 3/4 (svezzamento)- 8- 12- 16- 20- 24 settimane di età. I campioni di sangue sono stati prelevati contemporaneamente durante la medesima visita in allevamento e successivamente sono stati conferiti ai laboratori della sezione Diagnostica dell'IZSLER.

### Esami sierologici e virologici

Su tutti i campioni è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti-PRRSV tramite ELISA indiretta kit IDEXX e quella di anticorpi anti-PCV2 tramite ELISA competitiva kit IZS-BS. La ricerca del virus della PRRS è stata condotta tramite una reazione One-Step RT-PCR multiplex con primers specifici, descritti da Persia et al., 2001, che permettono di differenziare il genotipo europeo dal genotipo americano mentre la PCR per PCV2 è stata condotta secondo il metodo indicato da Olvera et al., 2004. Le PCR sono state eseguite su pool di 5 sieri in modo da ottenere 1 o 2 pool per ogni classe di età. La classe di età è stata considerata positiva quando almeno un pool dava esito positivo.

### Analisi statistica

È stata stimata la prevalenza dei soggetti sieropositivi per PCV2 e PRRSV ed i relativi intervalli di confidenza al 95%.

Per ogni classe di età, è stata stimata la prevalenza degli allevamenti PCR positivi per PCV2 e PRRSV ed i relativi intervalli di confidenza al 95%.

Sono stati stimati i valori medi e i rispettivi intervalli di confidenza al 95% del titolo sierologico per PCV2 e per PRRSV, mediante analisi della varianza a effetti misti con variabile dipendente il titolo sierologico, variabile indipendente la categoria di età di appartenenza dell'animale ed effetto random l'azienda.

Infine mediante un modello a effetti misti con variabile dipendente il titolo sierologico, con covariate la positività in PCR e la categoria età, con effetto random l'azienda, è stata valutata la differenza in media del titolo sierologico tra soggetti PCR positivi e PCR negativi.

## RISULTATI

Tutte le aziende coinvolte sono risultate sieropositive per PCV2 e 9 sono per PRRSV. Complessivamente sono stati esaminati i sieri di 630 animali (90 suini per ognuna delle 7 classi di età) e di questi 472 (74,9%) presentavano anticorpi anti-PCV2 e 462 (73,3%) presentavano anticorpi anti-PRRSV (Tab.1).

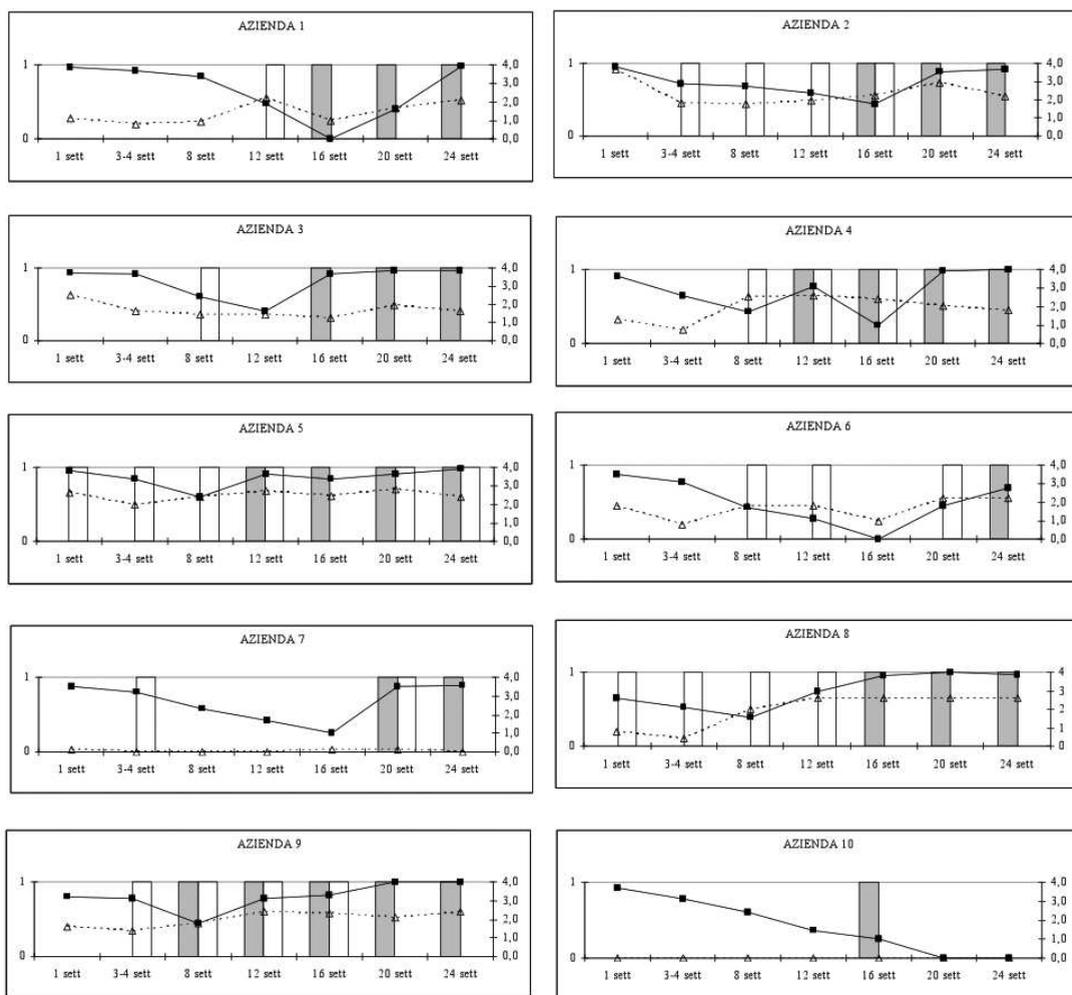
	n°	%
Aziende PCV2 positive	10	100
Aziende PRRSV positive	9	90
Suini PCV2 positivi	472	74,9 (I.C.95%: 71,9-77,9)
Suini PRRSV positivi	462	73,3 (I.C.95%: 70,3-76,3)

**Tabella 1:** Positività verso PCV2 e PRRSV.

**Table 1:** PCV2 and PRRSV positivity.

In merito all'infezione da PCV2 i titoli anticopali siano mediamente alti nella prima settimana di età e sono compresi in un range tra 2,6 e 3,9. Tendono poi a diminuire progressivamente sino alle 8- 12- 16- o 20 settimane. In 4 aziende (4-5-8-9) il titolo anticorpale medio più basso si evidenzia nei soggetti di 8 settimane, in altre 4 ( 1-2-6-7) si evidenzia in quelli di 16 settimane mentre nell'azienda 3 e nell'azienda 10 il titolo più basso si ha rispettivamente nei suini di 12 e 20 settimane di età. Nell'azienda 10 i soggetti di 20 e 24 settimane di età risultato sprovvisti di anticorpi nei confronti di PCV2 (Fig. 2). Il genoma virale di PCV2 viene rilevato tramite PCR a partire dai soggetti di 16 settimane di età (aziende 1-2-3-8-10), mentre in 2 aziende (7-6) viene rilevato per la prima volta nei suini di 20 e 24 settimane di età. Soltanto in 3 aziende (4-5-9) viene rilevato prima delle 16 settimane di età (Fig.2). La viremia interessa contemporaneamente più categorie di animali. Mediamente risultano positive 2,9 classi di età. Fanno eccezione l'azienda 10 che risulta positiva solo a 16 settimane e l'azienda 6 positiva solo a 24 settimane.

Per quanto riguarda l'infezione da PRRSV una sola azienda è risultata PRRSV sieronegativa. Nelle aziende sieropositive i titoli anticorpali anti-PRRSV alla nascita risultano ampiamente variabili, (da 0,1 a 3,7), tendono poi a diminuire nei suini di 3-4 settimane di età. I titoli più bassi, nella maggior parte dei casi si evidenziano nei suini di 3-4 settimane di età, in corrispondenza dello svezzamento. Solo in 2 aziende (2,3) i titoli più bassi si evidenziano a 8 e a 16 settimane di età. L'azienda 7 si comporta in maniera difforme e solo pochi soggetti risultano sieropositivi (Fig.1). 2 aziende (5,8) presentano suini viremici già nella prima settimana di vita. Il genoma virale è stato evidenziato a partire da soggetti in svezzamento in 3 aziende (2,7,9), a 8 settimane di età in altre 3 aziende (3,4,6) e a 12 settimane nell'azienda 1. La viremia è stata rilevata mediamente in 2,8 classi di età.



PCR PCV2      PCR PRRSV ; PCR: 0 = esito negativo, 1 = esito positivo

Titolo anticorpale PCV2      Titolo anticorpale PRRSV ; titolo sierologico espresso in Log10 per PCV2, in rapporto S:P per PRRSV

**Fig. 1:** Profili sierologici e virologici delle 10 aziende.

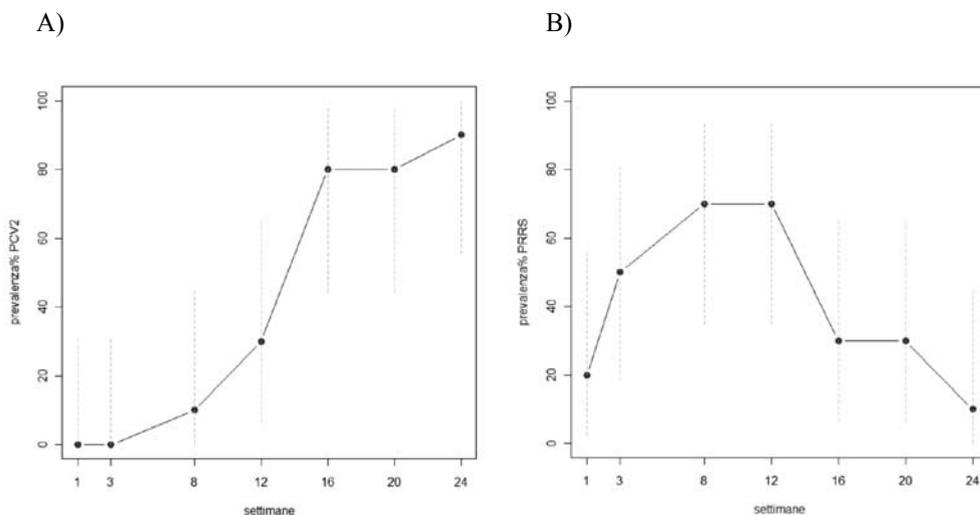
Figure 1: Serological and virological profile of the 10 farms.

Come si può evidenziare nelle tabelle e nei grafici di seguito riportate (Tab.2-3, Fig.2 A-B) l'infezione da PCV2 si verifica soprattutto nei soggetti di 16- 20- e 24 settimane di età mentre quella da PRRSV nei soggetti di 8- e 12 settimane di età. A 1 e a 3-4 settimane il genoma virale di PCV2 non è stato riscontrato in nessuna delle aziende coinvolte. La viremia da PCV2 è stata evidenziata a partire dalle 8 settimane anche se 9 (90%) aziende sono risultate viremiche dopo le 12 settimane e 7 (70%) dopo le 16 settimane di età (Tab.2-3, Fig.2 A) . La viremia da PRRSV viene invece più frequentemente evidenziata prima delle 8 (80%) e delle 12 (90%) settimane di et, ma a differenza di PCV2, PRRSV viene evidenziato in tutte le classi di età coinvolgendo soprattutto i soggetti di 8 e 12 settimane di età (Tab.2-3, Fig.2 B).

Età	PCV2	PRRSV
1 settimana	0 (IC95%:0 -30.85)	20 (IC95%:2.52 - 55.61)
3-4 settimane	0 (IC95%:0 -30.85)	50 (IC95%:18.71 - 81.29)
8 settimane	10 (IC95%:0.25 - 44.5)	70 (IC95%:34.75 - 93.33)
12 settimane	30 (IC95%:6.67 - 65.25)	70 (IC95%:34.75 - 93.33)
16 settimane	80 (IC95%:44.39 - 97.48)	30 (IC95%:6.67 - 65.25)
20 settimane	80 (IC95%:44.39 - 97.48)	30 (IC95%:6.67 - 65.25)
24 settimane	90 (IC95%:55.5 - 99.75)	10 (IC95%:0.25 - 44.5)

**Tab.2:** Prevalenza della positività in PCR per PCV2 e PRRSV.

**Table 2:** Prevalence of PCR positivity for PCV2 and PRRSV.



**Figura 2:** Prevalenza della positività in PCR per PCV2 (A) e PRRSV (B).

**Figure 2:** Prevalence of PCR positivity for PCV2 (A) and PRRSV (B).

	<i>Positivi per PRRSV prima delle 8 settimane</i>	<i>Positivi per PRRSV prima delle 12 settimane</i>	<i>Positivi per PCV2 dopo le 12 settimane</i>	<i>Positivi per PCV2 dopo le 16 settimane</i>
N°	8	9	9	7
%	80	90	90	70

**Tab.3:** Positività in PCR per PRRSV prima delle 8 - 12 settimane di età e per PCV2 dopo le 12 - 16 settimane di età **Table 3:** *PRRSV PCR positivity before 8 - 12 weeks of age, PCV2 PCR positivity after 12 - 16 weeks of age.*

Nelle tabelle (Tab.4 A-B, Fig.3 A-B) sono riportati i valori medi e rispettivi intervalli di confidenza al 95% stimati mediante analisi della varianza con effetto random l'azienda.

A)

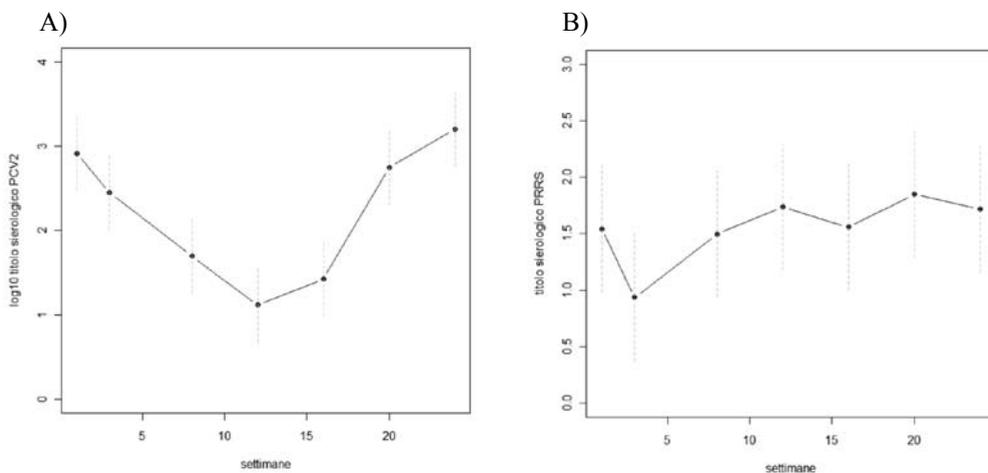
Settimane	1	3-4	8	12	16	20	24
Stima del valore medio	2,914	2,45	1,698	1,118	1,426	2,747	3,202
IC95%	2,472-3,356	2,008-2,893	1,256-2,14	0,676-1,561	0,983-1,868	2,304-3,189	2,76-3,644

B)

Settimane	1	3-4	8	12	16	20	24
Stima del valore medio	1,544	0,936	1,495	1,737	1,558	1,847	1,716
IC95%	0,985-2,103	0,377-1,495	0,936-2,054	1,179-2,296	1-2,117	1,289-2,406	1,157-2,275

**Tabella 4:** stima dei valori medi e dei rispettivi intervalli di confidenza al 95% del log10 del titolo sierologico per PCV2 (A) e del titolo sierologico per PRRSV (B), mediante modello a effetti misti con fattore random l'azienda.

**Table 4:** *Estimation of average values and their confidence intervals at 95% of PCV2 log 10 serological titre (A) and of PRRSV serological titer (B), using a mixed effects model with random factor the farm.*



**Fig.3:** stima dei valori medi e dei rispettivi intervalli di confidenza al 95% del log10 del titolo sierologico per PCV2 (A) e del titolo sierologico per PRRSV (B), mediante modello a effetti misti con fattore random l'azienda.

**Figure 3:** *Estimation of average values and their confidence intervals at 95% of PCV2 log 10 serological titre (A) and of PRRSV serological titer (B), using a mixed effects model with random factor the farm.*

Sono riportati i quartili e il valore medio per i soggetti PCR positivi e PCR negativi per PCV2 e PRRSV (Tab.5-6).

PCV2	min	1 quartile	mediana	3 quartile	max	media
PCR -	0	0	2,004	3	4	1,839
PCR +	0	2,004	3	4	4	2,699

**Tab.5:** titolo anticorpale per PCV2 in relazione al riscontro virologico in PCR.

*Table 5: PCV2 antibody titre related to virological response in PCR.*

PRRSV	min	1 quartile	mediana	3 quartile	max	media
PCR -	0	0	1,2	2,2	4,6	1,29
PCR +	0	1,2	1,8	2,7	4,3	1,84

**Tab.6:** valore S/P per PRRSV in relazione al riscontro virologico in PCR.

*Table 6: PRRSV S/P related to virological response in PCR.*

Quando si tiene conto della categoria di età e della correlazione tra valori di soggetti appartenenti allo stesso allevamento, per PCV2, i soggetti PCR positivi hanno presentato un titolo sierologico di 1.13 (IC 95%: 0.81- 1.45) unità logaritmiche più grande, rispetto ai soggetti PCR negativi. Per PRRSV tale differenza non è risultata statisticamente significativa.

## DISCUSSIONE

Gli anticorpi verso PCV2 rilevati alla nascita tendono a diminuire progressivamente fino a raggiungere i valori più bassi nei soggetti di 8-16 settimane di età. Gli anticorpi materni sono, infatti, normalmente evidenziabili sino alle 3-11 settimane di età (Larochelle et al., 2003, McKeown et al., 2005). Nei soggetti di età maggiore è evidente un incremento nei titoli legato probabilmente ad una stimolazione del sistema immunitario indotta dalla replicazione virale. Nella maggior parte delle aziende PCV2 è stato rilevato tramite PCR dopo le 12 e 16 settimane e il picco del titolo anticorpale è stato registrato nei soggetti di 24 settimane di età. Picco che in seguito ad infezione naturale è stato evidenziato da altri Autori a 16 settimane di età (Carasova et al., 2007). Nella maggior parte dei casi ad essere positivi in PCR sono i soggetti di 16- 20- e 24- settimane di età. Rispetto a quanto riportato in letteratura, dove il periodo a rischio per l'infezione da PCV2 è stato riconosciuto tra le 6 e le 15 settimane di età (Larochelle et al., 2003, Sibila et al., 2004), negli allevamento oggetto dello studio i suini hanno contratto l'infezione da PCV2 in una fase più avanzata. Anche in studi recenti condotti in Spagna e in Norvegia, la prima fase del post svezzamento non è più segnalata come periodo a rischio per l'infezione da PCV2, ma ad esserlo sono la fase di ingrasso comprese tra 16 e le 21 settimane. (Grau-Roma et al., 2009, Brunborg et al., 2010). In considerazione di questo spostamento in avanti del periodo d'infezione è importante adeguare i piani vaccinali applicati in azienda al fine di assicurare un'efficace copertura del periodo più a rischio. Il fatto che l'infezione da PCV2 possa verificarsi durante la fase di ingrasso piuttosto che durante la fase di svezzamento comporta senza alcun dubbio ripercussioni economiche più gravi per l'azienda.

In merito alla dinamica dell'infezione PRRSV le categorie d'età a rischio sono risultate quelle comprese tra le 8 e le 12 settimane, confermando lo svezzamento come momento cruciale per l'infezione da PRRSV. Recentemente, anche in uno studio olandese, sono stati indicati i soggetti di 9-16 settimane come soggetti ideali per rilevare il virus della PRRS in assenza di manifestazioni cliniche (Duijnhof et al., 2011). A differenza di quanto osservato

per PCV2, nel caso dei PRRSV non è stato notato un picco dei valori S/P medi senza che fossero evidenti grandi differenze tra le varie classi di età. La durata media della positività in PCR per PCV2 è risultata essere di 2,9 classi di età e per PRRSV di 2,8. La corretta interpretazione di questo dato ottenuto in uno studio di tipo cross-sectional deve portare ad una riflessione più che sulla durata di mesi della viremia sull'interessamento contemporaneo di più categorie di animali e di diversi settori dell'allevamento. Considerando le classi di età risultate più frequentemente positive in PCR negli allevamenti oggetto dello studio l'infezione da PRRSV precede di circa 2 mesi quella da PCV2. La gestione affiancata delle due problematiche ha portato a considerare che in taluni episodi il controllo della PRRS abbia potuto contenere l'impatto di PCV2.

Lo studio ha permesso di confermare la diffusione delle infezioni da PCV2 e PRRSV all'interno delle aziende italiane e delle diverse categorie di età dei suini. La conoscenza della dinamica di queste infezioni all'interno di una azienda è importante per approntare un piano di profilassi considerato che in molte realtà la gestione di una di queste patologie non può essere disgiunta da quella dell'altra. Lo studio ha inoltre messo in evidenza come nella maggior parte delle aziende testate l'infezione da PCV2 si sia presentata in una fase più tardiva rispetto a quanto sin ora riportato. È stato invece confermato che l'infezione da PRRSV ha interessato soprattutto la prima fase del post-svezzamento. Va comunque tenuto conto che trattandosi di uno studio con campionamento cross sectional che ha coinvolto 10 aziende le considerazioni proposte dovranno essere ulteriormente approfondite ed integrate con il coinvolgimento di un numero maggiore di aziende.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison JL. (1994) Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec* 134, 567-573.
2. Allan GM, Ellis JA (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
3. Allan GM, McNeilly F, Ellis JA, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I, Kennedy S. (2000) Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of Virology* 145, 2421–2429.
4. Carasova P, Celer V, Takacova K, Trundova M, Molinkova D, Lobova D, Smola L. (2007) The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res. Vet. Sci.* 83, 274–278
5. Duinhof TF, et al.. (2011) Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet. Microbiol*, doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.001
6. Grau-Roma L, Hjulsgager CH, Sibila M, Kristensen CS, López-Soria S, Enøe C, Casal J, Bøtner A, Nofrarias M, Bille-Hansen V, Fraile L, Baekbo P, Segalés J, Larsen EL. (2009) Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.* 135, 272–282
7. Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Paul PS. (2001) Experimental reproduction of severe disease in CD/CD Pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology* 38, 528–539.
8. Houben S, Van Reeth K, Pensaert MB (1995) Pattern of infection with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on swine farms in Belgium. *J. Vet. Med.* 342, 209–215

9. Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. (2003) Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67, 114–120
10. McKeown NE, Opriessnig T, Thomas P, Guenette DK, Elvinger F, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. (2005) Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2, *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 12, 1347–1351
11. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M. (2004) Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117, 75-80.
12. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
13. Persia D, Pacciarini ML, Cordioli P, Sala G. (2001) Evaluation of three RTPCR 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, 440-441.
14. Rodriguez-Arriola M, Segalés J, Calsamiglia M, Resendes AR, Balasch M, Plana-Duran J, Casal J, Domingo M. (2002) Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *American Journal of Veterinary Research* 63, 354–357
15. Rose N, Larour G, Le Diguierher G, Eveno E, Jolly JP, Blanchard P, Oger A, Le Dimna M, Jestin A, Madec F. (2003) Risk factors for porcine Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev. Vet. Med.* 61, 209–225.
16. Rovira A, Balasc M, Segales J *et al.* (2002) Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *J Virol* 76: 3232-3239.
17. Sarli G, Ostanello F, Morandi F, Fusaro L, Gnudi M, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F. (2009) Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Vet Rec* 164, 519-523
18. Segalés J, Domingo M. (2002) Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
19. 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

# CASO DI IDATIDOSI IN SUINI D'ALLEVAMENTO REGOLARMENTE MACELLATI

## HYDATIDOSIS CASE IN REGULARLY SLAUGHTERED PIGS FARM

PERRONE V. \*, CAVALLERO S. \*\*, CITO G. \*

\* *Az. U.S.L. Roma B, Servizio Veterinario, Dipartimento di Prevenzione, V.le Palmiro  
Togliatti, 1280 – 00155 Roma*

\*\* *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Sezione di Parassitologia, Università di  
Roma “La Sapienza”, P.le Aldo Moro, 5 – 00185 Roma*

**Parole chiave:** suino, macellazione, *Echinococcus granulosus*, strain G1, idatidosi  
**Key words:** pig, slaughtering, *Echinococcus granulosus*, G1 strain, hydatidosis

**Riassunto.** L'echinococcosi è una zoonosi riemergente che rappresenta ancora un problema economico e di sanità pubblica in molte aree del mondo e in particolare nel bacino del Mediterraneo dove rappresenta una delle principali parassitosi endemiche, correlata anche con l'ampia diffusione della pastorizia nella regione. Molte specie animali, sia domestiche sia selvatiche, agiscono come ospiti intermedi: il suino ad esempio rappresenta uno degli ospiti intermedi di *Echinococcus granulosus* ma il suo reperimento nell'allevamento industriale intensivo è diventato assai raro. Nel presente lavoro si riporta un caso di idatidosi riscontrato in due suini regolarmente macellati provenienti da un allevamento intensivo della provincia di Pordenone. Le analisi molecolari condotte su una regione del DNA mitocondriale (*rrnS*) hanno permesso di assegnare gli isolati allo strain G1 (Common Sheep Strain), il più diffuso nella zona del Mediterraneo, anche se nel suino il genotipo più frequente è il G7 (Pig Strain).

**Summary.** Hydatidosis is a worldwide re-emerging zoonotic disease and it still represents a public health and economic issue, especially for sheep-farming communities in the Mediterranean area, where the parasite is endemic. Several species of domestic livestock and wild life animals act as intermediate hosts: for instance, the swine is an intermediate host for *Echinococcus granulosus*, but the report of the cestode in pigs farm is rare. In the present work is described a hydatidosis case in regularly slaughtered pigs from an intensive farming in Pordenone province. Molecular analysis carried out on a mitochondrial ribosomal region (*rrnS*) led to assign the isolates to G1 Common Sheep Strain, the most widespread strain in Mediterranean region, even if G7 is the common pig strain.

### INTRODUZIONE

L'idatidosi o echinococcosi cistica (EC) è una zoonosi ri-emergente causata da Cestodi Ciclofillidei della famiglia Taeniidae, appartenenti alla specie *Echinococcus granulosus*.

L'echinococcosi rappresenta un importante problema di sanità pubblica, ma anche economico, in numerose aree del mondo. Assume particolare rilevanza in America Latina, nell'Africa sub-Sahariana e nelle altre zone dove la parassitosi è endemica (Mongolia, Repubblica Popolare Cinese, Asia del sud-est, Australia). Nel bacino del Mediterraneo in particolare è una delle principali parassitosi degli animali in produzione zootecnica e riveste un notevole significato sociale e sanitario per l'elevata diffusione nell'uomo (Garippa *et al.*, 2004; Busi *et al.*, 2007).

Il ciclo biologico di *E. granulosus* si svolge tra un ospite definitivo carnivoro (un canide) ed un ospite intermedio non carnivoro (ovino, bovino, equino, suino). L'uomo è un ospite accidentale

che può infestarsi ingerendo uova del parassita presenti nell'ambiente contaminato da feci infette dell'ospite definitivo e che danno origine alla forma larvale del parassita all'interno dell'ospite intermedio. La forma larvale (metacestode) è detta idatide, una cisti sferica, uniloculare e ripiena di liquido che può contenere protoscolici vitali o cisti figlie. Le sedi di localizzazione più comuni delle cisti sono fegato e polmoni.

Sino ad oggi sono state descritte sei morfospecie: *E. granulosus* (Batsch, 1786), *E. multilocularis* (Leuckart, 1863), *E. oligarthrus* (Diesing, 1863), *E. vogeli* (Rausch et Bernstein, 1972), *E. shiquicus* (Xiao et al., 2005), ed *E. felidis* (Hutter et al., 2008). All'interno della morfospecie *E. granulosus* sono stati ad oggi identificati dieci strains (G1 - G10) di cui sette agenti provati di zoonosi, che presentano una diversa specificità per l'ospite intermedio.

In Italia la presenza di *E. granulosus* è soprattutto legata alle zone con forte presenza dell'allevamento ovino come Sardegna, Sicilia, Campania, Lazio ed Abruzzo (Garippa et al., 2004); le informazioni relative alla presenza dei diversi strains di *E. granulosus* nei diversi ospiti e regioni di provenienza sono riassunte in Tabella 1.

**Tabella1:** Situazione in Italia, relativamente alla caratterizzazione di diversi strains di *E. granulosus* da diversi ospiti intermedi

**Table1:** Italian situation on the characterization of different *E. granulosus* strains, from different intermediate hosts.

STRAIN	OSPITE	REGIONE	REFERENZE
G1	Ovini, bovini, suini	Sardegna	
	Bufali	Campania	Varcasia et al, 2006
	Ovini	Lazio	Rinaldi et al, 2008
	Ovini	Abruzzo	Busi et al, 2004
	Ovini	Lombardia	Giangaspero et al, 2006
	Ovini	Sicilia	Manfredi et al, 2006
	Ovini	Sicilia	Giannetto et al, 2004
	Ovini		Brianti et al, 2006
	Bovini	Emilia Romagna	Busi et al, 2007
	Bovini	Friuli Venezia Giulia	Casulli et al, 2008
	Bovini	Piemonte	
	Bovini	Trentino	
Bovini	Veneto		
G2	Ovini	Sardegna	Busi et al, 2004
	Bovini	Lazio	Casulli et al, 2008
	Bovini	Umbria	
	Bovini	Veneto	
G3	Ovini	Lazio	Busi et al, 2004
	Bufali	Campania	Rinaldi et al, 2008
	Ovini	Abruzzo	Giangaspero et al, 2006
	Bufali	Umbria	Casulli et al, 2008
G4	Equini	Sardegna	Scala et al, 2006 Varcasia et al, 2008
G5	Bovini	Trentino Alto Adige	Casulli et al, 2008
G7	Suini	Sardegna	Varcasia et al, 2006

Ad oggi, i dati che riguardano la prevalenza dell'echinococcosi nel suino in Italia confermano la presenza del parassita, sebbene con percentuali piuttosto basse: in un'indagine condotta dal 1979 al 1983 in 88 stabilimenti di macellazione, la prevalenza è risultata dello 0,2-0,4% e nell'allevamento industriale la parassitosi è attualmente da considerare rarissima con localizzazione prevalentemente epatica rappresentata quasi esclusivamente da cisti uniloculari profonde (Marcato, 1998). Altri studi confermano tali dati, sebbene le percentuali di prevalenza nel suino appaiono basse se confrontate con quelle riguardanti gli ovini, sia in allevamenti della Campania che della Sardegna (Cringoli et al., 1998; Varcasia et al., 2006).

I dati riportati da Varcasia et al., (2007) sulla prevalenza dell'echinococcosi nei suini da macellazione familiare in Sardegna riferiscono invece di percentuali più elevate (11%), confermando l'ipotesi di un legame tra la persistenza del parassita nel territorio e questo tipo di macellazione e la modalità di allevamento.

Nel presente studio viene riportata la presenza di *E. granulosus* (strain G1) in due suini regolarmente avviati alla macellazione, provenienti da un allevamento della provincia di Pordenone.

## MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono state analizzate cisti di *E. granulosus* reperite durante l'ispezione *post mortem* in due suini provenienti da un allevamento della provincia di Pordenone, regolarmente macellati presso uno stabilimento privato nel comune di Roma (i codici assegnati alle cisti analizzate sono CT9 e CT10).

Le cisti sono state reperite sia a livello epatico che polmonare, prelevate e conservate in etanolo al 70% ed inviate al Laboratorio della Sezione di Parassitologia (Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive) della Sapienza Università di Roma, per effettuare studi di caratterizzazione molecolare basati sull'analisi di sequenza della regione mitocondriale *rrnS*, codificante per la subunità ribosomale minore 12S. Diversi studi hanno dimostrato che tale regione genomica è in grado di distinguere i vari strains della morfospécie *E. granulosus* (Thompson and McManus, 2002).

Dalla membrana interna (proligena) è stato prelevato un frammento di tessuto da cui è stato estratto il DNA seguendo le istruzioni del Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega).

Il DNA genomico ottenuto è stato utilizzato come template per l'amplificazione, mediante PCR, della regione di interesse utilizzando le seguenti condizioni: 10 min. 94°C, seguiti da 30 cicli di 30 sec. a 94°C, 1 min. a 55°C, 1 min. a 72°C, seguiti da 7 min. a 72°C.

I primers utilizzati sono (Dinkel et al, 1998):

**P60-for** 5' – TTA AGA TAT ATG TGG TAC AGG ATT AGA TAC CC – 3'

**P375-rev** 5' – AAC CGA GGG TGA CGG GCG GTG TGT ACC – 3'

Terminata la reazione di amplificazione, 5µl del prodotto di ciascun campione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,5%, contenente bromuro di etidio, e gli amplificati sono stati visualizzati esponendo il gel sotto la luce UV.

Gli ampliconi positivi sono stati preparati per il sequenziamento mediante purificazione secondo il protocollo SureClean (BIOLINE) e spediti alla MWG-EUROFINS DNA. Successivamente le sequenze ottenute sono state controllate manualmente a livello di elettroferogramma utilizzando il programma CHROMAS LITE e allineate utilizzando il programma ClustalW. (1.8) Multiple Sequence Alignments, implementato nel software MEGA4 (Tamura et al., 2007). A scopo comparativo sono state incluse nell'allineamento tutte le sequenze degli strains di *Echinococco* corrispondenti alla stessa porzione genomica depositate in GenBank (GenBank accession numbers: AY462129, DQ822451, AY462127, AY462126, AY462128).

## RISULTATI

L'amplificazione della regione *rrnS* codificante per la subunità ribosomale misura circa 300bp. Le sequenze utili ottenute, dopo purificazione e editing manuale, misurano 235bp. L'allineamento dei due individui analizzati con le altre sequenze reperite in GenBank indicano che le cisti rinvenute nei due suini appartengono allo strain G1 (Figura 1). Nell'individuo CT9 è presente una differenza nucleotidica rispetto allo strain G1 in posizione 231 (G231C).

**Figura 1:** Allineamento delle sequenze degli individui analizzati (CT9, CT10) a confronto con le sequenze degli strains di *Echinococcus granulosus* disponibili in GenBank, per la stessa regione genomica (*rrnS*). I puntini rappresentano l'identità rispetto alla sequenza di riferimento G1.

**Figure 1:** Sequences alignment of isolates under study (CT9, CT10) compared to sequence of *E. granulosus* available in GenBank for the same genomic region (*rrnS*). Dots represent identity to G1 sequence.

```

G1_AY462129 AAATGGTTTG GCAGTGAGCG ATTCTTATTA GGGGAATATG CATAGTGAAG [50]
CT9          ..... [50]
CT10        ..... [50]
G3_DQ822451  ..... [50]
G5_AY462127  .....G...G...A... [50]
G6_AY462126  .....G...G...A... [50]
G7_AY462128  .....G...G...A... [50]

G1_AY462129  GATGGTCCAC CTATTAGTTT ACTCTTTTTA TGTTGGTGTA TGCTCGGTTT [100]
CT9          ..... [100]
CT10         ..... [100]
G3_DQ822451  ..... [100]
G5_AY462127  .....T...G...A... [100]
G6_AY462126  .....T..C...G...A... [100]
G7_AY462128  .....T..C...G...A... [100]

G1_AY462129  GATATTATTG TTGAATAATT TAAGTTTGTG TAGTTTTAGT TAAGCTAAGT [150]
CT9          ..... [150]
CT10         ..... [150]
G3_DQ822451  ..... [150]
G5_AY462127  .....C..T..GG..G...C... [150]
G6_AY462126  .....C..T..GG..G...C... [150]
G7_AY462128  .....C..T..GG..G...C... [150]

G1_AY462129  CTATGTGCTG CTTATTGGAG TTTTGTGTG TTACATTAAT AAGGGTGTTA [200]
CT9          ..... [200]
CT10         ..... [200]
G3_DQ822451  .....G... [200]
G5_AY462127  .....G... [200]
G6_AY462126  .....CG...G [200]
G7_AY462128  .....G...G [200]

G1_AY462129  TTGTAAGATG ATGTGATTTA GGACTTAATA GTAAT [235]
CT9          .....C... [235]
CT10         ..... [235]
G3_DQ822451  ...G... [235]
G5_AY462127  .....T...A.T... [235]
G6_AY462126  .....T...A.T... [235]
G7_AY462128  .....T...A.T... [235]

```

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'echinococcosi cistica è una zoonosi generalmente grave, talvolta mortale, con costi significativi per la sanità pubblica (nel 1990 veniva stimato a 11.000 € il costo chirurgico di un caso di idatidosi umana) e dal 1991, su disposizione del Ministero della Sanità, l'ISTAT non riporta più nei suoi annuari il numero di casi di idatidosi umana, vista la loro netta diminuzione (solo 36 casi rispetto alla media annuale di circa 100 casi osservata negli ultimi decenni; Gabriele et al., 2004). Oltre ai mutamenti socio-economici e igienico-sanitari, la diminuzione dell'incidenza dei casi può essere spiegata anche alla luce dei cambiamenti adottati a livello delle strategie di allevamento e delle misure di prevenzione e controllo messe in atto, sia in ambito medico sia veterinario (*one medicine - one health*). A tutt'oggi l'attività di ispezione svolta nei macelli (sequestro e distruzione dei visceri parassitati degli ospiti intermedi) resta un elemento fondamentale nel contrasto di tale zoonosi, che sembra essere confinata per lo più nelle situazioni di macellazione domestica o di allevamenti non intensivi. E' inoltre importante sottolineare come, a partire dagli anni '60, l'allevamento del suino sia andato incontro a profonde trasformazioni: infatti, al cambiamento nelle strategie di allevamento, da allevamenti rurali di piccole dimensioni a stabilimenti zootecnici a carattere intensivo, è seguito anche il cambiamento delle patologie tipiche della specie suina (Marruchella et al., 2007). Nonostante ciò, l'allevamento e la macellazione del suino destinato al consumo umano rimangono argomenti di interesse attuale perché risulta evidente come, a seconda delle specifiche realtà geografiche, i suini possano provenire da allevamenti di tipo intensivo o dalla tradizionale macellazione domiciliare. Studi di caratterizzazione molecolare che hanno lo scopo di monitorare le parassitosi in entrambi gli ambiti risultano quindi importanti, al fine di avere un quadro epidemiologico aggiornato e per comprendere a fondo i meccanismi che stanno alla base delle modalità di trasmissione di zoonosi di importanza sanitaria, come l'echinococcosi.

## BIBLIOGRAFIA

- Brianti E., Poglayen G., Virga A., Manfredi M.T., Di Cerbo A.R., Varcasia A., Tomaselli A. Giannetto S. (2006) Echinococcosis and hydatid disease in Sicily. *Parassitologia*, 48: 330.
- Busi M., Šnábel V., De Liberato C., D'Amelio S. (2004) Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts in Italy reveals the presence of three distinct genotypes. *Parassitologia* 46 (1): p164.
- Busi M, Snábel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, De Liberato C, D'Amelio S. (2007) Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol.* 150(1-2):75-83.
- Casulli A., Manfredi M.T., La Rosa G., Cerbo A.R., Genchi C., Pozio E. (2008) *Echinococcus ortleppi* and *E. granulosus* G1, G2 and G3 genotypes in Italian bovines. *Vet. Parasitol.* 155: 168-72.
- Dinkel A., von Nickisch-Roseneck M., Bilger B., Merli M., Lucius R., Romig T. (1998) Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7): 1871-6.
- Gabriele F., Bortoletti G., Conchedda M., Palmas C., Ecça A.R., 2004. Idatidosi cistica umana in Italia: un problema di salute pubblica? Tra passato e presente. *Parassitologia*, 46(1-2), 39-43.

- Garippa G., Varcasia A., Scala A. Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. (2004) *Parassitologia* 46 (4): 387-91.
- Giangaspero, A., Paoletti, B., Gatti, A., Iorio, R., Traversa, D., Capelli, G., Manfredi, M.T., Varcasia, A., Garippa, G., (2006) The epidemiological scenario of echinococcosis in the Abruzzo region. *Parassitologia* 48, 338
- Giannetto S., Poglayen G., Brianti E., Sorgi C., Gaglio G., Canu S., Virga A. (2004) An epidemiological updating on cystic echinococcosis in cattle and sheep in Sicily, Italy. *Parassitologia* 46 (4): 423-4.
- Manfredi M.T., Casulli A., La Rosa G., Di Cerbo A.R., Trevisio K., Genchi C., Pozio E. (2006) *Echinococcus multilocularis* in north Italy. *Parassitol.* 48 (1-2): 43-6.
- Marcato P. S. (1998) Patologia Suina, Prima Edizione, Edagricole Bologna.
- Marruchella G., Romanelli P., Baffoni M., Saccoccia M., Salini G., Di Guardo G. (2007) Cisticercosi Epatica da *Cysticercus tenuicollis* e Broncopolmonite Verminosa da *Metastrongylus* spp. in Suini Macellati per Uso Familiare. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Vol. XXXIII, 269-275.
- Rinaldi L, Maurelli MP, Veneziano V, Capuano F, Perugini AG, Cringoli S. (2008) The role of cattle in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in an endemic area of southern Italy. *Parasitol Res.* 103(1):175-9.
- Scala A., Garippa G., Varcasia A., Tranquillo V.M., Genchi C. (2006) Cystic echinococcosis in slaughtered sheep in Sardinia (Italy). *Vet. Parasitol.* 135: 33-8.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecul. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson, R.C.A., McManus, D.P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitol.* 18, 452-457.
- Varcasia A., Canu S., Lightowlers M.W., Scala A., Garippa G. (2006) Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* strains in Sardinia. *Parasitol. Res.* 98: 273-7.
- Varcasia A., Toscirci G., Pedes T., Pipia A.P., Marrosu R., Scala A. Garippa G. (2007) Cystic Echinococcosis in pigs and wild boars of Sardinia (Italy). Proceedings of 6th International Symposium on the Mediterranean Pig, 102-105.

# DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DI 18 ANTIBIOTICI NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA CHOLERAESUIS*

## EVALUATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF 18 ANTIBIOTICS AGAINST *SALMONELLA CHOLERAESUIS*

RUGNA G.<sup>1</sup>, CEVIDALLI A.E.<sup>2</sup>, D'INCAU M.<sup>1</sup>, MERIALDI G.<sup>1</sup>

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy*

*2 Intervet Schering-Plough Animal Health, Italy*

**Key Words:** Minimum Inhibitory Concentration (MIC), *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar choleraesuis

**Riassunto.** E' stata testata la sensibilità di 49 ceppi di *Salmonella choleraesuis* nei confronti di 18 antibiotici, valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) mediante tecnica della micro-diluizione in brodo. Tutti i ceppi sono risultati sensibili al ceftiofur (breakpoint ( $\mu\text{g/ml}$ ):  $S \leq 2$ ;  $I=4$ ;  $R \geq 8$ ), il 77,6% ha manifestato sensibilità nei confronti del florfenicolo (breakpoint ( $\mu\text{g/ml}$ ):  $S \leq 2$ ;  $I=4$ ;  $R \geq 8$ ). Tra gli antibiotici per cui non esistono valori di *breakpoint* viene riportata la distribuzione delle MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) ottenute. Tra questi antibiotici, quelli che hanno mostrato valori di  $\text{MIC}_{90}$  considerati compatibili con una buona efficacia *in vitro* sono risultati i fluorochinolonici (Enrofloxacin e Danofloxacin) e la gentamicina.

**Abstract.** Forty-nine *Salmonella choleraesuis* isolates were tested for susceptibility to 18 antimicrobials by micro-dilution broth method.

All the isolates resulted susceptible to ceftiofur (breakpoint ( $\mu\text{g/ml}$ ):  $S \leq 2$ ;  $I=4$ ;  $R \geq 8$ ) and 77,6% were susceptible to florfenicol (breakpoint ( $\mu\text{g/ml}$ ):  $S \leq 2$ ;  $I=4$ ;  $R \geq 8$ ). Regarding those antibiotics whose *breakpoint* values are not defined, the MIC distribution ( $\mu\text{g/ml}$ ) is reported. Antimicrobials with low  $\text{MIC}_{90}$  values were fluoroquinolones (enrofloxacin and danofloxacin) and gentamicin.

### INTRODUZIONE

*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar choleraesuis (*S. choleraesuis*) è un batterio patogeno ospite-specifico, causa nel suino di forme cliniche molto gravi, con tasso di letalità fino al 100% (Weide-Botjes *et al.*, 1996). L'infezione può essere associata a setticemia, enterocolite, localizzazione in organi con forme di polmonite ed epatite; occasionalmente può manifestarsi con meningite, encefalite e aborto (Griffith R.W. *et al.*, 2006). Durante gli anni '50 e '60, *S. choleraesuis* (compresa la variante Kunzendorf) era il sierotipo più comunemente isolato dal suino nel Mondo. Attualmente è ancora abbastanza presente in Nord America e Asia, ma viene rilevato piuttosto raramente in Australia e nei Paesi dell'Europa Occidentale (Fedorka-Cray *et al.*, 2000). Nonostante la prevalenza inferiore rispetto ad altri sierotipi, *S. choleraesuis* è anche nella nostra realtà causa di episodi di mortalità anche molto gravi, seppure sporadici.

Dal punto di vista epidemiologico, *S. choleraesuis* viene isolata da suini clinicamente ammalati, mentre raramente viene isolata dai mangimi o da altri serbatoi animali; la principale fonte di nuove infezioni è quindi rappresentata da soggetti eliminatori e

ambienti contaminati dalle feci di questi suini ( Gray *et al.*, 1996).

Durante la fase acuta di malattia i maiali possono eliminare fino a  $10^6$  UFC di *S. choleraesuis* per grammo di feci. L'alta densità di animali, lo stress da trasporto, patologie carenziali o patologie infettive possono aumentare l'eliminazione da parte dei portatori ed innalzare la suscettibilità dei suini esposti. In infezioni sperimentali è stato dimostrato che *S. choleraesuis* persiste nella giunzione ileo-ciecale, nei linfonodi, nelle tonsille e nei polmoni fino a 12 settimane dall'infezione.

L'influenza degli antibiotici sulla durata e sulla frequenza di eliminazione di *Salmonella* spp. da parte di animali portatori è stata poco studiata. In campo umano è riconosciuto che la somministrazione di sostanze antimicrobiche prolunghi la durata dello stato di portatore; al contrario nel suino, una vigorosa terapia antibatterica nella prima fase di una setticemia causata da *S. choleraesuis* può significativamente ridurre l'intensità e la durata dell'eliminazione del microrganismo per via fecale ( Gray *et al.*, 1996).

Nel caso della salmonellosi setticemica del suino da *S. choleraesuis*, lo scopo principale della terapia consiste nel minimizzare la gravità della forma clinica, limitare la diffusione dell'infezione e della malattia e prevenire la ricomparsa della malattia nel gruppo. Il raggiungimento di questi obiettivi è particolarmente difficile; *S. choleraesuis* è spesso resistente *in vitro* a molti antibiotici usati in clinica suina. Inoltre, durante la forma clinica, il microrganismo occupa una nicchia intracellulare inaccessibile a molti comuni antibiotici.

Il test di sensibilità agli antibiotici è particolarmente necessario nelle situazioni in cui l'agente patogeno appartiene a specie batteriche per le quali è stata documentata resistenza a sostanze comunemente usate nella pratica clinica.

Per tale motivo abbiamo valutato la sensibilità di 49 ceppi di *S. choleraesuis* nei confronti di 18 antibiotici appartenenti a diverse classi farmaceutiche, valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC). La scelta degli antibiotici è stata effettuata principalmente sulla base delle molecole comunemente usate nella clinica suina, compatibilmente con la disponibilità sul mercato di un kit commerciale.

Questo studio vuole fornire un contributo all'utilizzo consapevole degli antibiotici in medicina suina, fornendo indicazioni di sensibilità *in vitro* utili alla scelta del farmaco terapeutico, tenendo sempre presente che altre considerazioni, quali la distribuzione nei vari distretti dell'organismo e la via di somministrazione, hanno comunque notevole importanza.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio include 49 ceppi di *Salmonella* sierotipo choleraesuis isolati nel corso del 2009 e collezionati dal Reparto di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Come controlli positivi sono stati usati tre microrganismi: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

La sensibilità antimicrobica degli isolati è stata determinata valutando la Minima Concentrazione Inibente (MIC) con il metodo della microdiluzione in piastra, utilizzando un prodotto commerciale costituito da piastre a 96 pozzetti contenenti un pannello di antibiotici disidratati a diverse concentrazioni (Sensititre®: Trek Diagnostic System Inc). Gli agenti antimicrobici utilizzati con le rispettive diluizioni d'uso sono stati i seguenti: ceftiofur (TIO) 0,25-8 µg/ml; gentamicina (GEN) 1-16 µg/ml; florfenicolo (FFN) 0,25-8 µg/ml; tiamulina (TIA) 0,5-32 µg/ml; clortetraciclina (CTET) 0,5-8 µg/ml; ossitetraciclina (OXI) 0,5-8 µg/ml; penicillina (PEN) 0,12-8 µg/ml; ampicillina (AMP) 0,25-16 µg/ml; danofloxacina (DANO) 0,12-1 µg/ml; neomicina (NEO) 4-32 µg/ml; trimetoprim/sulfametossazolo (SXT) 2/38 µg/ml; spectinomicina (SPE) 8-64 µg/ml;

ml; tilosina tartrato (TYLT) 0,5-32 µg/ml; tulatromicina (TUL) 1-64 µg/ml; tilmicosina (TIL) 4-64 µg/ml; clindamicina (CLI) 0,25-16 µg/ml; sulfadimetossina (SDM) 256 µg/ml; enrofloxacin (ENRO) 0,12-2 µg/ml.

L'altestimento e la valutazione della MIC sono stati effettuati secondo le raccomandazioni del CLSI. Il valore della MIC è stato considerato come la minima diluizione di antibiotico in grado di inibire una crescita batterica visibile. Per tutti i microrganismi testati sono stati annotati i valori di MIC di ciascun principio attivo. Per gli antibiotici per cui esistono valori di *breakpoint* raccomandati dal CLSI specifici per *S. Choleyaesuis*, vale a dire ceftiofur e florfenicolo, sono state calcolate le percentuali di sensibilità (%S), resistenza (%R) e di risposta intermedia (%I). Per i rimanenti antibiotici, per i quali tale valore non è disponibile, è stata considerata la distribuzione dei ceppi batterici nel range di MIC ottenuto.

## RISULTATI

La Tabella 1 mostra la distribuzione dei valori di MIC (µg/ml) dei 18 antibiotici testati nei confronti dei 49 ceppi di *S. choleraesuis*. Per quanto riguarda gli antibiotici per cui sono presenti dei valori di *breakpoint*, si osserva un elevato grado di attività antimicrobica per il ceftiofur, che presenta il 100% di efficacia *in vitro* nei confronti dei ceppi testati. Una buona attività *in vitro* nei confronti del microrganismo in oggetto viene riscontrata anche per il florfenicolo, con il 77,6% di ceppi sensibili.

**Tabella 1.** Distribuzione dei valori di MIC (µg/ml) di 18 antibiotici testati nei confronti di 49 ceppi di *S. choleraesuis*

Antibiotico	MIC (µg/ml)												%S	%I	%R			
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256				512		
Ampicillina				3					46(≥32)									
Ceftiofur			7	38	4											100		
Clindamicina									49(≥32)									
Clortetraciclina						3		46(≥16)										
Danofloxacin	38	2	1	8														
Enrofloxacin	37	3		9														
Florfenicolo			1	1	33	3	4	7(≥16)								77,6	8,2	14,3
Gentamicina				46	1		2											
Neomicina						8				41(≥64)								
Ossitetraciclina					2	1		46(≥16)										
Penicillina							3	46(≥16)										
Spectinomina									7	27	15(≥128)							
Sulfadimetossina												3	46(≥512)					
Tiamulina										1	48(≥64)							
Tilmicosina										1		48(≥128)						
Tilosina							49(≥8)											
Trimet/Sulfamet (2/38)					6													
Tulatromicina						1	36	8	3			1(≥128)						

Sui principi attivi per i quali non è possibile determinare l'attività in termini di sensibilità/resistenza a causa della mancanza di valori di *breakpoint*, è possibile fare alcune considerazioni osservando i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> riscontrati (Tabella 2).

Entrambe le tetraciline testate (ossitetraciclina e clortetraciclina) manifestano una scarsa attività antimicrobica nei confronti di *S. choleraesuis*, presentando valori di MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub> superiori a 16 µg/ml. Anche per i beta-lattamici, la clindamicina, la neomicina, i macrolidi e il trimetoprim+sulfamidici, la maggior parte dei ceppi testati manifestano resistenza fino alle più alte concentrazioni testate.

I fluorochinolonici (danofloxacin ed enrofloxacin) e la gentamicina presentano valori di MIC<sub>90</sub> molto bassi.

**Tabella 2.** Valori di MIC<sub>50</sub> (µg/ml) e MIC<sub>90</sub> (µg/ml) degli antibiotici testati

Antibiotico	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Ampicillina	>16	>16
Ceftiofur	1	1
Clindamicina	>16	>16
Clortetraciclina	>8	>8
Danofl oxacina	<0,12	1
Enrofloxacin	<0,12	1
Florfenicolo	2	>8
Gentamicina	<1	<1
Neomicina	>32	>32
Ossitetraciclina	>8	>8
Penicillina	>32	>32
Spectinomocina	64	>64
Sulfadimetossina	>256	>256
Tiamulina	>32	>32
Tilmicosina	>64	>64
Tilosina	>4	>4
Trimet/Sulfamet	>2/38	>2/38
Tulatromicina	8	16

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tra gli antibiotici testati è risultata una efficace attività da parte di una cefalosporina come il ceftiofur (100% dei ceppi sensibili). Il florfenicolo è risultato efficace sulla maggioranza dei 49 ceppi di *S. choleraesuis* (77,6%). MIC<sub>90</sub> compatibili con una elevata efficacia *in vitro* sono state evidenziate anche per i fluorochinoloni e la gentamicina. Questi dati concordano in parte con i pochi dati riscontrati in bibliografia; in particolare in una ricerca condotta in Taiwan (Chao-Fu *et al.*, 2004) i valori di MIC riscontrati per i fluorochinoloni sono sovrapponibili a quelli ottenuti in questo studio; al contrario, i ceppi di *S. choleraesuis* da noi esaminati hanno mostrato una maggiore sensibilità *in vitro* alla Gentamicina. A questo proposito è importante considerare che è stato segnalato l'emergere di ceppi di *S. choleraesuis* resistenti ai fluorochinoloni ed alle cefalosporine ad ampio spettro. Tale evenienza è stata riportata in Giappone (Hidetake *et al.*, 2004), in Taiwan (Chiu *et al.*, 2004) ed in Thailandia (Kulwichit *et al.*, 2007). In questi ultimi due Paesi è probabile che l'utilizzo di questo tipo di antibiotici come promotori di crescita abbia potuto portare all'emergere di fenomeni di resistenza. Appare inoltre interessante, dai nostri risultati, la scarsa efficacia della neomicina che, pur appartenendo alla classe degli aminoglicosidi, ha mostrato valori di MIC più elevati rispetto alla gentamicina.

Tra gli antibiotici esaminati, si osserva che la Sulfadimetossina ha efficacia nulla nei confronti di tutti i ceppi testati (MIC<sub>50</sub> ≥ 256 µg/ml), così come l'associazione trimethoprim e sulfamidico (sulfametossazolo) ed i macrolidi. Anche i beta-lattamici utilizzati presentano valori di MIC piuttosto elevati.

La scelta dell'antibiotico da utilizzare nella terapia di questa malattia non può basarsi solo su considerazioni di farmaco-dinamica (quali l'attività inibente *in vitro*) ma deve considerare diversi aspetti relativi alla farmaco-cinetica. Fra questi i più importanti sono, a nostro giudizio, la capacità del farmaco di raggiungere il batterio e la via di somministrazione.

Per quanto riguarda il primo aspetto, è da tener presente che nella patogenesi della salmonellosi gioca un ruolo importante la capacità di replicazione intracellulare del batterio, soprattutto in cellule immunitarie come macrofagi e cellule dendritiche (Foley & Lynne, 2008), che ne permettono la diffusione nei vari distretti organici. Ne consegue l'importanza dell'utilizzo di

sostanze antimicrobiche che abbiano buone caratteristiche di penetrazione in cellule ospiti, caratteristica farmacocinetica dimostrata per esempio per il florfenicolo (Soto *et al.*, 2010) ed i fluorochinoloni (Goodman and Gilman, 2006).

Per quanto riguarda la via di somministrazione, l'uso di antibiotici sistemici per il trattamento della salmonellosi setticemica è ampiamente praticato ed è efficace nell'attenuare la gravità della patologia, mentre farmaci che, pur essendo attivi *in vitro*, non sono assorbiti a livello intestinale dopo somministrazione orale (es. gentamicina) appaiono meno indicati. Le formulazioni iniettabili sono spesso utilizzate su suini che hanno la forma clinica, permettendo di aumentarne il tasso di sopravvivenza. La medicazione orale (mangime o acqua da bere) non è di solito sufficiente per trattare i suini clinicamente ammalati, dal momento che questi ultimi mangiano poco e spesso non consumano acqua a sufficienza per il raggiungimento della dose farmacologica efficace. La medicazione orale, però, iniziata nelle fasi precoci di un focolaio contribuisce a ridurre il numero di nuovi casi, diminuendo l'eliminazione con le feci ed aumentando la dose infettante richiesta per infettare i soggetti dei box sani.

## BIBLIOGRAFIA

- Chao-Fu C., Lin-Chu C., Yung-Fu C., Michael C., Tai-Sheng C. (2004) Antimicrobial Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* **14**: 153–157
- Chiu C.H., Wu T.L., Su L.H., Chu C., Chia J.H., Kuo A.J., Chien M.S., Lin T.Y. (2004) Isolation of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Lancet*, **363**: 1285-1286
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards -3a ed., M31-A3, Vol 28 No. 8
- Fedorka-Cray P.J., Gray J.T., Wray C. (2000) “Salmonella infections in pigs” in: Wray C., Wray A. (eds) “Salmonella in domestic animals”. CAB International, Wallingford, pp 1191–1207
- Foley S.L., Lynne A.M. (2008) Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.*, **86**: E173-E187
- Goodman L.S., Gilman A. (2006) The Pharmacological basis of therapeutics, 11<sup>th</sup> ed., MacGraw-Hill, Chapter 42
- Gray J.T., Fedorka-Cray P.J., Stabel T.S., Kramer T.T. (1996) Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 141–146
- Griffith R.W., Schwartz K.J., Meyerholz D.K. (2006) “Salmonella” in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 9th ed., Blackwell Publishing, pp 739-754
- Hidetake E., Ayako M., Kanako I., Akemi K., Sanae S., Yutaka T., Toshio T. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 266–270
- Kulwicht W., Chatsuwat T., Unhasuta C., Pulsrikarn C., Banktrakulnonth A., Chongthaleong A. (2007) Drug-resistant nontyphoidal *Salmonella* bacteremia. *Thailand. Emerg. Infect. Dis.*, **13**: 501-502
- Soto E., Endris R.G., Hawke J.P. (2010) In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**: 4664–4670
- Weide-Botjes M., Liebisch B., Schwarz S., Watts J.L., (1996) Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar choleraesuis field isolates and differentiation from homologous live vaccine strains suisaloral and SC-54. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2460–2463.

# MALATTIA DI AUJESZKY: L'ORDINE DI NASCITA DEL SUINETTO COME POSSIBILE ELEMENTO DI CRITICITA'

## *PSEUDORABIES: THE PIGLET BIRTH ORDER AS A POSSIBLE CRITICAL POINT*

SENSI M., FELIZIANI F., PAPA P., ORTENZI R., ZINGARETTI G.,  
ZEMA J., COSTARELLI S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*

**Parole chiave:** Malattia di Aujeszky, immunità passiva, ordine di nascita

**Key words:** Pseudorabies, passive immunity, birth order

**Riassunto.** I suinetti nascono con un sistema immunitario non ancora completamente sviluppato. Per tale ragione è necessario che assumano velocemente la giusta quantità di colostro atto a fornire un'adeguata riserva energetica ed un'efficace protezione immunitaria.

Le frequenti contrazioni uterine che caratterizzano il parto della scrofa possono essere causa di scarsa vitalità degli ultimi soggetti partoriti, con conseguente difficoltà a raggiungere la mammella o a manifestare una suzione efficace. La giusta assunzione di colostro può, pertanto, venire compromessa e condurre ad un inadeguato trasferimento dell'immunità passiva. La ridotta protezione immunitaria crea le condizioni per cui tali animali possano costituire dei veri e propri "clusters" recettivi a diversi agenti eziologici.

Nello svolgere attività di supporto diagnostico in un allevamento sierologicamente positivo alla Malattia di Aujeszky si è voluto approfondire l'aspetto legato alla immunità passiva dei suinetti. Lo scopo è stato quello di comprendere il ruolo che potrebbe avere questa categoria di animali nella diffusione del virus e nella perpetuazione dell'infezione.

**Abstract.** Newborn piglets have a not fully developed immune system. They must acquire maternal immuno-globulins from ingested colostrum until their immune system becomes fully developed. Frequent uterine contractions characterize the sow's farrowing. These contractions reduce oxygenation to the unborn piglets and increase the perinatal mortality and morbidity. The ability of weak piglets to seek a teat and suckle is impaired. The right intake of colostrum may be altered, resulting in inadequate transfer of passive immunity. The reduced immune protection can play a role in creating receptive clusters for different causative agents. During our diagnostic activity in a herd serologically positive for Aujeszky's disease, we studied the passive immunity in some piglets in order to understand their role in spreading of the virus and its perpetuation in the farm.

### INTRODUZIONE

Il suinetto nasce con un sistema immunitario non ancora completamente sviluppato. La natura epitelio coriale della placenta della scrofa, infatti, non permette il passaggio di determinate molecole e quindi del necessario corredo di immunoglobuline capaci di

fornire la corretta protezione immunitaria al giovane animale (7). Il suinetto quindi, nel periodo che va dalla nascita alla maturità del proprio sistema immunitario (intorno all'età di svezzamento), è completamente dipendente dalla madre per quanto concerne le sue possibilità di sopravvivenza. Per tale ragione è necessario che assuma, quanto più velocemente possibile, la giusta quantità di colostro che gli fornisca un'adeguata riserva energetica ed un'efficace protezione immunitaria.

Le immunoglobuline vengono assorbite dalla mucosa intestinale del suinetto nelle prime 36 ore di vita (2). Quindi, la possibilità di raggiungere quanto più velocemente possibile un capezzolo "funzionante" rappresenta una discriminante importante ai fini della capacità di sopravvivenza del giovane animale. .

Inoltre l'assenza di una vera e propria "cisterna" nella mammella della scrofa e la liberazione di colostro per periodi molto brevi (circa 20 – 30 secondi) (3), crea inevitabili lotte fra i neonati. Il suinetto deve poter assumere i 20 – 30 g di colostro normalmente rilasciati da un capezzolo funzionante in quel breve lasso di tempo. E' sufficiente ritardare anche di 1 solo secondo l'inizio di tale assunzione per perdere fino al 10% del quantitativo totale (8).

E' fondamentale quindi che vengano rispettati al meglio i fabbisogni, fisiologici e di benessere, della scrofa e della sua prole. Qualsiasi fattore che determini una "alterata" assunzione di colostro comporta, inevitabilmente, una alterazione del patrimonio immunitario di ciascun individuo e crea disomogeneità dello stato immunitario della figliata (1).

Nello svolgere attività di supporto diagnostico in un allevamento sierologicamente positivo alla Malattia di Aujeszky, sono state suggerite diverse misure atte al controllo dell'infezione. Tra queste si è voluto approfondire l'aspetto legato alla immunità passiva dei suinetti allo scopo di comprendere il ruolo che potrebbe avere questa categoria di animali nella diffusione del virus e nella perpetuazione dell'infezione.

Scopo del presente lavoro è stato quello di approfondire le dinamiche immunitarie in un allevamento di suini, a ciclo chiuso, dove, nonostante la corretta applicazione della profilassi vaccinale nei confronti della Malattia di Aujeszky (con relativa riforma dei riproduttori risultati positivi al monitoraggio sierologico), si continuavano ad evidenziare sieropositività nei soggetti in accrescimento.

## **MATERIALI E METODI**

Si è operato all'interno di un allevamento da riproduzione, a ciclo chiuso dove nel corso degli ultimi controlli sierologici previsti dal Piano di Monitoraggio e Controllo per la Malattia di Aujeszky, erano state evidenziate ancora delle positività fra i soggetti del reparto "messa a terra" e magronaggio.

L'allevamento in questione, con un organico di oltre 300 scrofe riproduttrici ed un'organizzazione del lavoro a bande settimanali, effettuava la profilassi nei confronti della Malattia di Aujeszky secondo quanto previsto dalla Normativa vigente, vale a dire vaccinazione di tutti i riproduttori (a tappeto) tre volte l'anno, con vaccino spento delecto, vaccinazione della progenie a 70 – 80 giorni di età e successivo richiamo dopo 4 settimane, con vaccino a virus vivo attenuato. E' stato pianificato un programma di monitoraggio sierologico che comprendeva il controllo delle scrofe al momento del parto e della loro progenie, in periodi successivi di accrescimento.

Sono state pertanto saggiate n° 12 scrofe (3 primipare e 9 pluripare) e le loro figliate ospitate nella stessa sala e giunte al parto nella medesima giornata. La sala parto, era organizzata con due file di gabbie parto in metallo, con pavimentazione in grigliato di

plastica, rialzate dal pavimento, separate da un corridoio centrale.

Per evidenziarne l'ordine di nascita i suinetti di ciascuna figliata sono stati identificati individualmente con numeri progressivi, mediante tatuaggio auricolare.

Le scrofe avevano ricevuto l'ultima vaccinazione nei confronti della Malattia di Aujeszky 48 gg prima del parto.

A parti espletati è stato effettuato un prelievo di sangue da ciascuna scrofa e relativa figliata (T 0). Ulteriori controlli sierologici sono stati effettuati nei suinetti a 14 giorni di vita (T 1) e 28 giorni (T 2) in concomitanza con la giornata di svezzamento.

Le aliquote di siero sono state stoccate in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  e qui mantenute fino al giorno del controllo sierologico.

Ogni campione di siero è stato saggiato per la ricerca di anticorpi nei confronti dell'antigene vaccinale e della glicoproteina E del virus della Malattia di Aujeszky (Idexx HerdCheck Anti PRV gpB®; Idexx HerdCheck Anti PRV gpI®; )

### Descrizione dello studio

È stata condotta un'indagine statistica tesa a valutare la copertura dell'immunità passiva: si è intesa come ipotesi nulla che tale copertura fosse omogenea nella popolazione di suinetti oggetto dello studio e che eventuali deficit immunitari (testimoniati dalla negatività al test sierologico) fossero distribuiti in forma del tutto casuale. L'ipotesi alternativa ha previsto, al contrario, che l'ordine di nascita possa avere un'influenza nella protezione immunitaria dei suinetti. In particolare che gli ultimi nati possano ricevere una minore difesa immunitaria. In questo caso le negatività al test sierologico si concentrerebbero nei soggetti nati nelle fasi terminali di ciascun parto.

A questo fine sono stati considerati "casi" quei suinetti in cui è stato riscontrato un risultato sierologico negativo in almeno uno dei tre test effettuati; al contrario i soggetti risultati positivi a tutte le prove sierologiche sono stati classificati come "controlli".

I soggetti morti durante l'esperimento non sono stati esclusi dallo studio analitico e, di questi, sono stati considerati i test effettuati prima della morte; i soggetti nati morti, invece, non sono stati inclusi nello studio.

Ai fini dell'analisi statistica sono stati eseguiti dei test per verificare la significatività delle stime ottenute dall'analisi dei dati (6). A questo scopo è stato usato il software Freeware "WINEPISCOPE" realizzato e distribuito dall'Università di Saragozza in collaborazione con le Università di Edimburgo e Wageningen.

### **RISULTATI**

I risultati dei controlli sierologici nelle scrofe e nelle relative figliate sono riassunti nella Tabella 1 (Anticorpi anti gpB).



I 149 suinetti sono stati registrati in base all'ordine di nascita (dal 1° all'ultimo di ogni figliata) e in base alla classificazione in "casi" (almeno un test sierologico negativo alla gpB) e "controlli" (tutti i test sierologici con risultato positivo alla gpB) (tabella 3).

**Tab. 3 -** *Suddivisione dei 149 suinetti in "casi" (sieronegativi) e "controlli" (sieropositivi) per ordine di nascita*

**Tab. 3 -** *Number of seronegative (cases) and sieropositive (controls) piglets splitted following birth order*

Ordine di nascita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Tot
<b>Casi</b>	0	1	1	1	1	0	1	2	0	3	4	3	1	1	2	1	22
<b>Controlli</b>	12	10	11	11	10	12	11	9	11	8	7	6	5	3	1	0	127

In totale sono stati riscontrati 22 suinetti sieronegativi alla gpB mentre i restanti 127 suinetti sono risultati sieropositivi.

Dividendo i suinetti in classi in base all'ordine di espulsione, si osserva che i soggetti nati tardivamente presentano una frequenza di "casi" superiore ai soggetti nati all'inizio del parto (Tabella 4)

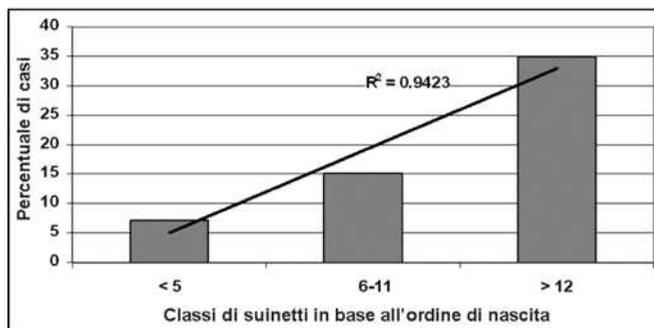
**Tab. 4 -** *Frequenza di "casi" per ordine di nascita suddiviso in 3 gruppi*

**Tab. 4 -** *"Cases" frequency following birth order (splitted into three groups)*

Ordine di nascita	"Casi"	"Controlli"	% "Casi"
1 - 5	4	54	7
6 - 11	10	58	17
12 - 16	8	15	53

Risulta evidente che nella fascia dei nati più tardivamente, la percentuale di "casi" vs "controlli" è di gran lunga maggiore rispetto a quella dei nati nelle fasi iniziali ed intermedie. Il test del "chi quadro" applicato ai dati sopra esposti appare significativo ( $X^2 = 10,18$  con due gradi di libertà  $p < 0.006$ ).

È anche rilevabile un trend riguardo la frequenza di casi che aumentano con il progredire dell'ordine di nascita (vedi grafico 1) e il relativo valore di  $R^2$  risulta molto elevato (0,9423).



**Grafico 1:** *Percentuale dei "casi" e valore  $R^2$*

**Graph. 1:** *"Cases" percentage and  $R^2$  value*

Come si evince dalla Tabella 5, i soggetti che nascono fra la decima e la dodicesima espulsione sembrano maggiormente colpiti dal fenomeno in osservazione.

**Tab. 5 - Percentuale di “casi” e “controlli” nei soggetti della 10<sup>a</sup> - 12<sup>a</sup> espulsione rispetto al resto dei suinetti**

**Tab. 5 - “Cases” and “Controls” percentage in piglets born from 10<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> position of birth order**

Ordine di nascita	Casi	Controlli	% Casi
10-12	10	21	32
resto	12	106	10

Assumendo la misura dell'Odds Ratio come stima del Rischio Relativo, si può notare che i soggetti che nascono in questa fascia mostrano una probabilità più che quadrupla di risultare negativi al test rispetto agli altri suinetti (Odds Ratio = 4,21 I.C. 1,45 – 12,21 L.C. 95% p<0,005).

Categorizzando la popolazione oggetto dello studio in modo diverso e cioè considerando la frequenza di casi tra i suinetti nati nelle ultime 4 espulsioni di ogni parto, si nota che questa è assolutamente maggiore rispetto ai suinetti nati nelle prime fasi del parto (vedi tabella 6)

**Tab. 6 - Percentuale di “casi” e “controlli” nei soggetti delle ultime 4 espulsioni rispetto al resto dei suinetti**

**Tab. 6 - “Cases” and “Controls” percentage in piglets born in the last 4 positions of birth order vs others**

Ordine di nascita	Casi	Controlli	% Casi
Ultimi 4	15	32	32
resto	7	95	7

In questo caso la probabilità di avere una copertura immunitaria inadeguata è addirittura di sei volte maggiore rispetto al resto della nidiata (Odds Ratio = 6,36 I.C. 2,18 – 19,13 L.C. 95% p<0,0005).

## DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio indicano che i suinetti nati più tardivamente manifestano una percentuale di casi di negatività sierologica agli anticorpi vaccinali per il virus della Malattia di Aujeszky, significativamente più elevata.

Cercando di analizzare le cause di questo fenomeno non si può prescindere da una valutazione sugli aspetti etologici del parto e dell'allattamento della specie suina. E' risaputo che, nella scrofa, gli eventi associati al parto condizionano fortemente le performance post-natali dei suinetti. Una delle complicazioni che si presenta con una certa frequenza nel suino durante il parto è l'ipossia o l'anossia causata dalle numerose contrazioni cui va incontro l'utero della scrofa (1).

La forza di tali contrazioni, infatti, può essere tale da comportare una riduzione di flusso circolatorio con conseguente scarso apporto di sangue ossigenato ai feti. Alcune volte le conseguenze sono particolarmente gravi per il determinarsi di lesioni o della rottura dell'arteria ombelicale o per un distacco prematuro della placenta.

Nella maggior parte dei casi, tuttavia, gli effetti di queste ipossie o anossie transitorie sono meno gravi comportando, semplicemente, una scarsa vitalità dei suinetti alla nascita. Questa situazione si presenta con maggiore frequenza negli ultimi nati della nidiate che subiscono più facilmente il fenomeno dell'ipossia intra-parto a causa del maggior numero di contrazioni uterine dovute alle espulsioni precedenti (1). I soggetti meno vitali tendono a liberarsi con maggior difficoltà dagli invogli fetali, condizione che può determinare situazioni di ipotermia. La temperatura rettale, pertanto, può risultare più bassa già dopo un'ora dalla nascita, come è stato dimostrato in alcuni studi, e la capacità di termoregolazione risulta fortemente compromessa (4,5).

La scarsa vitalità del suinetto dovuta ai fenomeni precedentemente descritti, lo porta a raggiungere la mammella con difficoltà e, anche qualora la raggiunga, a manifestare una ridotta capacità di suzione.

In queste circostanze viene compromessa la giusta assunzione del colostro da parte dei neonati (5) con conseguente inadeguato trasferimento di immunità passiva, nonostante l'eiezione di colostro sia costante per circa 7 ore dopo la nascita dell'ultimo suinetto.

## CONCLUSIONI

In riferimento alle problematiche dell'allevamento oggetto di studio, è possibile che il "Critical Point" sia costituito dai soggetti nati nelle ultime espulsioni. In numerosi di questi suinetti si riscontra una sieropositività alla gpB, al momento della nascita, che non viene confermata nei controlli successivi. In alcuni casi, addirittura, si registra una costante sieronegatività. La ridotta protezione immunitaria crea le condizioni per cui tali animali possano costituire dei veri e propri "clusters" recettivi al Virus della Malattia di Aujeszky e favorirne, così, la persistenza in allevamento.

Quanto emerso dal nostro studio ci porta a riflettere su due aspetti.

Il primo relativo alla necessità di una costante e precisa attenzione della gestione peripartale nelle moderne linee genetiche iperprolifiche. L'elevato numero di nati per figliata e la vulnerabilità dei neonati richiedono particolari attenzioni ed adeguate condizioni manageriali per garantire ad ogni singolo suinetto idonee possibilità di sopravvivenza.

Questo significa che nelle moderne unità di allevamento debbano essere sempre assicurate :

- Supervisione dei parti, controllo della loro durata ed assistenza;
- Cura immediata dei soggetti nati sottopeso e/o degli ultimi nati;
- Rapido raggiungimento della mammella ed adeguata assunzione di colostro da parte di ogni suinetto,
- Idonee temperature ambientali specifiche per la madre ed i suinetti (utilizzo di lampade riscaldanti aggiuntive da posizionare nella zona posteriore della gabbia da rimuovere a parto completato).

L'altra riflessione riguarda l'aspetto legato al ruolo degli ultimi suinetti delle nidiate come possibili "cluster" di recettività e perpetuazione del virus della Malattia di Aujeszky. I risultati ottenuti sembrano confermare questo potenziale rischio suggerendo che un monitoraggio sierologico nei confronti della glicoproteina B, eseguito in scrofe e suinetti nel periodo "parto-svezzamento", possa costituire un valido strumento di verifica del piano vaccinale applicato. Riteniamo possibile, infatti, che la vaccinazione delle scrofe effettuata "a tappeto" per una razionalizzazione del management e dei costi aziendali possa determinare situazioni di disomogeneità nella risposta immunitaria alla vaccinazione. Di conseguenza, l'immunità passiva trasferita alla prole può risultare inadeguata e condurre a situazioni di criticità dello stato immunitario dell'allevamento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alonso-Spilsbury M., Ramirez-Necoechea R., Gonzales-Lozano M., Mota-Rojas D., Trujillo-Ortega M.E., (2007) "Piglet Survival in Early Lactation: A review" *J. Anim. Vet. Adv.*, 6 (1): 76-86;
2. De Passillé A.M.B., Rushen J. Harstock T.G. (1988) "Ontogeny of teat fidelity in pigs and its relation to competition at suckling" *Can. J. Anim. Sci.*, 68:325-338;
3. Fraser D., Phillips P.A., Thompson B.K., Pajor E.A., Weary D.M., Braithwaite L.A. (1995) "Behavioural Aspects of Piglets Survival and Growth" in M.A. Varley (Ed.). *The Neonatal Pig. Development and Survival*. CAB International, UK, pp:287-312;
4. Herpin P., Le Dividich J., Claude H.J., Fillaut M., De Marco F., Bertin R., (1996) "Effects of the level of asphyxia during delivery on viability at birth and early post-natal vitality of newborn pigs" *J. Anim. Sci.*, 74:2067-2075;
5. Herpin P., Le Dividich J., (1998) "Termorregulation y Entorno" in M.A. Varley (Ed.). *El Lechon Recién Nacido*. Acribia, Espana, pp 87-97;
6. Pfeiffer D. 2010 "Veterinary epidemiology: an introduction" Wiley-Blackwell
7. Rooke J.A., Bland I.M. (2002) "The acquisition of passive immunity in the newborn piglet" *Livestock Production Science* 78, 13-23;
8. Rushen J. and Fraser D. (1989) "Nutritive and non-nutritive suckling and the temporal organization of the suckling behaviour of domestic piglets". *Dev. Psychobiol.* 22:789-801;

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA PROFILASSI  
ANTICOCCIDICA CON TOLTRAZURIL (CEVAZURIL® 50mg/ml)  
IN CONDIZIONI DI BASSA PRESSIONE INFETTIVA DA ISOSPORA  
SUIS IN UN ALLEVAMENTO SUINICOLO INDUSTRIALE**

**EFFECT EVALUATION OF ANTICOCCIDIA PROPHYLAXYS  
WITH TOLTRAZURIL (CEVAZURIL® 5%) IN A LOW ISOSPORA  
SUIS INFECTIVE PRESSURE BREEDING FARM**

VERONESI G.<sup>°</sup>, NIGRELLI A.D.<sup>°°</sup>, CASAPPA P.<sup>°°°</sup>.

<sup>°</sup> Veterinario LP, Mantova

<sup>°°</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia, Sezione Diagnostica di Mantova

<sup>°°°</sup> CEVA VETEM, Agrate Brianza (MB)

**Parole chiave:** Toltrazuril, Isospora Suis, Diarrea, Suini

**Key words:** Toltrazuril, Isospora Suis, Diarrhea, Pigs

**Riassunto.** Scopo dello studio è stato verificare gli effetti del trattamento con toltrazuril (CEVAZURIL® 50mg/ml) in una azienda con bassa prevalenza dell'infezione da *Isospora Suis*, parassita responsabile della coccidiosi nei suinetti. Dopo aver eseguito i controlli di laboratorio, tramite campioni fecali, che hanno dimostrato la presenza del parassita in azienda, si sono esaminati gli effetti del trattamento su una popolazione di soggetti paragonandone i risultati a quelli ottenuti da una popolazione di soggetti controllo. I dati relativi alle performance, in particolare l'incremento in peso dei gruppi trattati, hanno testimoniato l'utilità del trattamento con toltrazuril anche in questa situazione mostrando una differenza statisticamente significativa nel 50% delle covate sottoposte a trattamento vs i controlli.

**Summary.** Aim of the study was to verify toltrazuril (CEVAZURIL® 50mg/ml) treatment effects in a swine farm with a low infection pressure level due to *Isospora suis*, agent of pigs Coccidiosis. After laboratory analysis, that demonstrated *Coccidia* presence in faecal samples, treatment effects, on treated subjects compared to a control group, has been investigated. Performance data, with a particular reference to the weight growth in treated piglets, proved toltrazuril treatment benefit also in this case, showing a statistically significant difference in 50% of treated litters vs controls.

## **INTRODUZIONE**

Toltrazuril è un principio attivo con attività coccidicida che agisce verso tutti gli stadi di sviluppo di questi parassiti intestinali (sporozoit, merozoit, micro- e macrogameti)(1). Ha una azione significativamente più elevata di altri principi attivi ad azione anticoccidica (come diclazuril e sufadimidina)(2). È utilizzato per la profilassi della coccidiosi suina, allo scopo di impedire che il parassita causa di tale problema, *Isospora Suis*, possa colonizzare e danneggiare l'epitelio intestinale, determinando, durante le varie fasi del proprio ciclo vitale, forme diarroiche che compaiono solitamente a partire da 4 giorni post-infezione(3), con feci liquide o pastose solitamente di colore da biancastro a giallastro, anche nella medesima covata di suinetti, caratterizzate per altro dalla totale assenza di sangue e che non rispondono ai trattamenti con antibatterici. I danni provocati da questo parassita sono essenzialmente dati da atrofia dei villi intestinali, desquamazione dell'epitelio intestinale ed enterite necrotica. Tali fenomeni hanno una importante ripercussione sulle performance dei suinetti colpiti e causano ritardi nella loro crescita anche gravi

(4), consentono uno sviluppo più semplice per eventuali infezioni secondarie e aumentano i costi per contenere i danni provocati ai suinetti stessi.

La patologia è spesso sottostimata, con prevalenze a livello aziendale che nelle varie nazioni europee vanno dal 40 al 100%(5,6,7,8,9), e può fornire riscontri di falsi negativi a causa della bassa intensità dell'infezione, di un campionamento delle feci eseguito in momenti non adatti, di una eliminazione delle oocisti discontinua. Lo strumento maggiormente utilizzato dal punto di vista diagnostico è l'esame di flottazione delle feci, eseguito su numerosi campioni provenienti dalle sale parto. Di norma le feci pastose contengono un maggior numero di oocisti delle feci più liquide(7).

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato eseguito in un allevamento commerciale a ciclo chiuso del Nord Italia privo di anamnesi patologica di Coccidiosi; a tale scopo si è proceduto alla raccolta di campioni fecali che sono stati successivamente sottoposti ad analisi per flottazione del materiale fecale.

### **Esame copro microscopico**

Al fine di eliminare la materia grassa presente nelle feci, è stata utilizzata la tecnica di concentrazione in etile acetato e formaldeide di Ridley-Allen parzialmente modificata.

In breve, un grammo di feci è stato risospeso in 7 ml di formalina al 10% e filtrato attraverso una garza sterile in una provetta da centrifuga. Dopo l'aggiunta di 3 ml di etile acetato le provette sono state agitate per 30 secondi su un agitatore meccanico e centrifugate a 3000 rpm per 2 minuti. Dopo la centrifugazione lo strato di grasso ed il surnatante venivano eliminati e si procedeva all'osservazione di 20 ul di sedimento al microscopio ottico a 200 ingrandimenti .

*ANIMALI E TRATTAMENTI* . Il disegno sperimentale ha coinvolto 160 suini di entrambi i sessi di razza large White per Landrace, nella fase sottoscrofa.

I soggetti di peso alla nascita variabile tra 0,9 e 2,6 kg di peso vivo venivano divisi in due gruppi di otto coppie di covate, per un totale di circa 80 soggetti cadauno.

**Gruppo A:** trattato con Toltrazuril (CEVAZURIL® 50mg/ml) per os alla dose giornaliera di 0,7 ml di prodotto, pari a 20 mg di principio attivo/capo (pari a 0,4 ml/kg p.v.), posologia prevista dalla registrazione del prodotto

**Gruppo B:** non trattato ma sottoposto alle procedure normalmente in uso in azienda.

Il trattamento veniva effettuato al 3° giorno di vita sui soggetti del gruppo trattato.

I suini erano mantenuti nella gabbia parto di nascita, quindi le covate sono state mantenute integre per la durata della sperimentazione, al di là del pareggiamento avvenuto nelle prime 24 ore di vita.

I soggetti sono stati identificati singolarmente con l'utilizzo di orecchini numerati per consentire la maggiore tracciabilità possibile dei diversi soggetti delle diverse covate ed evitare rimescolamenti in momenti successivi delle stesse. Il peso medio dei soggetti del gruppo trattato alla nascita era di 1,84 kg, mentre per i soggetti del gruppo controllo non trattato era di 1,54 kg.

I soggetti del gruppo controllo e trattato sono stati sottoposti a 3 pesate consecutive; alla nascita, al 10° giorno di vita e allo svezzamento per valutare l'incremento in peso delle covate.

## **OSSERVAZIONI CLINICHE E RILIEVI ZOOTECNICI**

Sul totale dei soggetti coinvolti nella sperimentazione, sono state valutate le frequenze dei casi di diarrea imputabili a Coccidiosi, il numero dei trattamenti parenterali e/o orali per terapia delle enteriti e la mortalità dopo il trattamento per il gruppo A e per il gruppo B nel periodo di lattazione successivo (circa 26 giorni). Gli animali che presentavano patologie diverse da quelle oggetto dello studio non proseguivano la prova e venivano trattati in modo specifico per la patologia manifestata.

Tutte le osservazioni giornaliere relative all'efficienza sono state registrate giornalmente nelle schede cliniche.

### ANALISI E VALUTAZIONI STATISTICHE

Unità sperimentale è stato considerato il singolo suinetto, annidato in gruppi (covate).

Come end point primario è stato considerato il peso dei singoli suinetti, considerati come unità sperimentale, annidati in gruppi, (covate).

L'analisi statistica, eseguita con il Test di Student su coppie di covate, con un livello di significatività al 95% e con 5 gradi di libertà, ha dato risultati statisticamente significativi a favore dei gruppi trattati in 4 coppie, mentre nelle restanti quattro non c'è stata differenza significativa tra i pesi.

Di seguito i confronti tra le quattro coppie di covate in cui si è evidenziata differenza statisticamente significativa. Va anche considerato che i totali dei pesi finali dei gruppi trattati sono stati di 617,4 kg, contro i 522,9 kg dei gruppi non trattati, con un maggior peso di 94,5 kg, che, considerando nulla la differenza di peso iniziale, porta a un maggior peso dei gruppi trattati di 67.3 kg, il 12% in più dei gruppi di controllo.

	trattati	controlli
Numerosità campione	8	10
Media	8,0625	5,0600
Dev. standard	1,5946	2,9281
<b>t</b>	<b>2,5982</b>	
<b>gradi di libertà</b>	<b>5</b>	
<b>P</b>	<b>0,0484</b>	

**La differenza fra le medie osservate è significativa per  $p < 0,05$**

	trattati	controlli
Numerosità campione	10	10
Media	9,6400	5,0600
Dev. standard	1,0024	2,9281
<b>t</b>	<b>4,6796</b>	
<b>gradi di libertà</b>	<b>5</b>	
<b>P</b>	<b>0,0054</b>	

**La differenza fra le medie osservate è significativa per  $p < 0,05$**

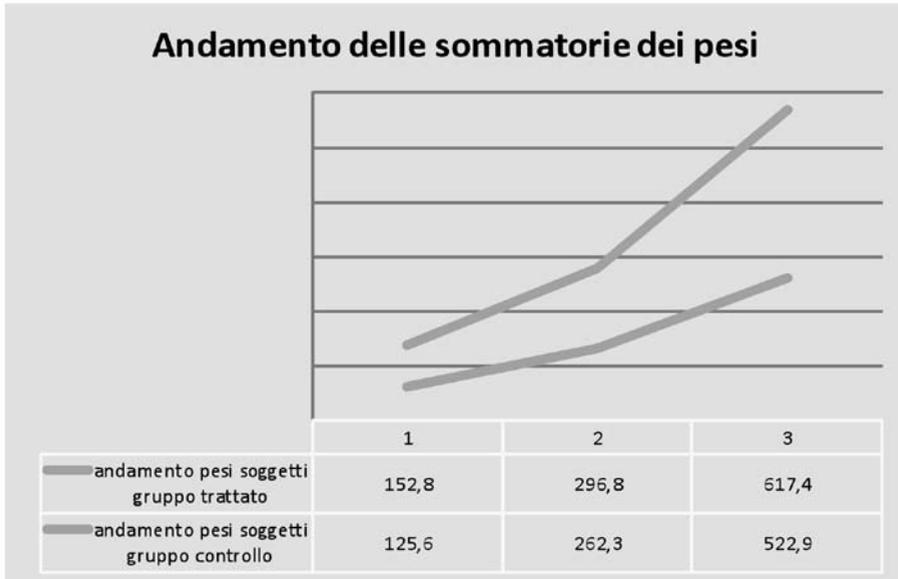
	trattati	controlli
Numerosità campione	10	10
Media	9,3500	5,8200
Dev. standard	2,1706	3,4341
<b>t</b>	<b>2,7477</b>	
<b>gradi di libertà</b>	<b>5</b>	
<b>P</b>	<b>0,0404</b>	

**La differenza fra le medie osservate è significativa per  $p < 0,05$**

	trattati	controlli
Numerosità campione	12	11
Media	6,8917	3,7545
Dev. standard	1,9824	3,2185
<b>t</b>	<b>2,8423</b>	
<b>gradi di libertà</b>	<b>5</b>	
<b>P</b>	<b>0,0361</b>	

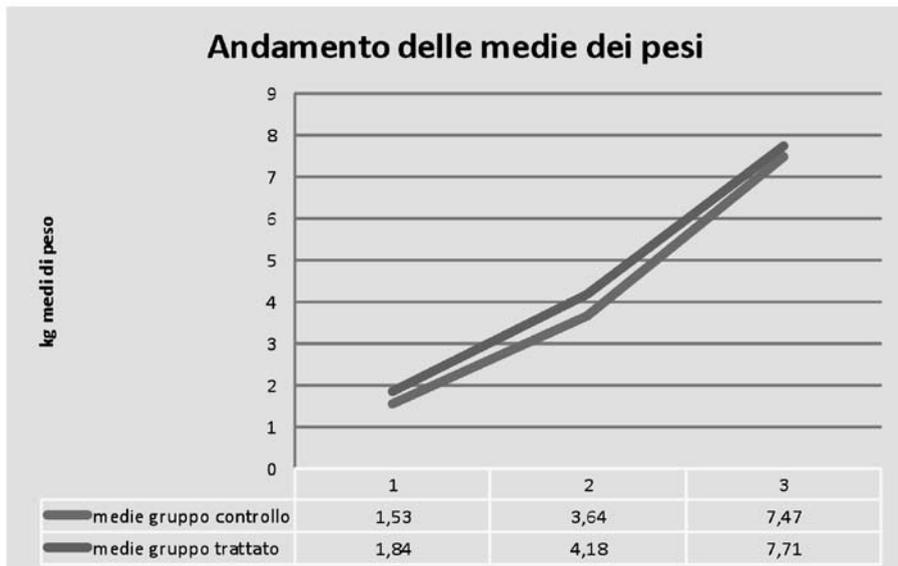
**La differenza fra le medie osservate è significativa per  $p < 0,05$**

**Grafico 1**



Di seguito (grafico 2) l'andamento delle medie dei pesi dei suinetti alle tre pesate. Si nota come, alla terza pesata, dopo la seconda nella quale c'è differenza significativa, le medie dei pesi tendano ad avvicinarsi, fatto dovuto principalmente alla mortalità, 12 suinetti morti nel gruppo di controllo, contro 5 nel gruppo trattato, evento che ha avvicinato le medie, e dovuto alla bassa prevalenza dell'infezione.

**Grafico 2**



Per tutte le procedure statistiche è stata considerata una significatività pari a  $p=0,05$ .

## CONCLUSIONI

L'analisi dei dati relativi ai pesi vivi ed agli accrescimenti ha consentito di evidenziare un effetto positivo del trattamento con Toltrazuril rispetto a quanto osservato in animali non trattati.

In particolare, tale effetto è evidente e significativo nel 50% delle covate trattate; tale dato inserendosi in un contesto di bassa prevalenza dell'infezione è di importanza ancora maggiore.

Il fatto che l'azienda testata non avesse mai effettuato in precedenza trattamenti contro la coccidiosi da *Isospora Suis* ha permesso di verificare tramite le analisi di laboratorio la presenza del parassita ed l'effetto della profilassi sulle performance sei soggetti.

Pur non avendo rilevato, ad eccezione dei casi documentati nelle schede di raccolta dati giornaliere, casi in cui potesse essere dimostrata una forma diarroica chiaramente dipendente dalla presenza del parassita, l'effetto della profilassi anticoccidica si è dimostrato efficiente, il che può indurre ad ipotizzare che la presenza dell'infezione, soprattutto a livello subclinico, sia un elemento di tenere maggiormente in considerazione. Sicuramente le metodiche di raccolta dei campioni rappresentano un elemento di grande importanza per consentire che le analisi effettuate possano fornire le risposte attese in modo certo.

È quindi possibile ipotizzare che anche nelle aziende prive di una anamnesi storica o con una anamnesi storica negativa riguardante la presenza di *I. Suis* sia bene periodicamente eseguire test di ricerca del parassita e che anche in presenza di prevalenze molto basse, il trattamento con Toltrazuril possa permettere di ottenere risultati migliorativi delle performance dei suinetti, con ripercussioni positive sullo stato sanitario dei settori sala parto e svezzamento.

*(Elaborazione statistica dei dati Ceva Vetem)*

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Mehlorn H.G., Z Parasitenkd 70, 173-182; 1984
- 2) Mundt H.C., Parasitol. Res., Studies on the efficacy of toltrazuril, diclazuril and sulphadimidine against artificial infections with *Isospora suis* in piglets V 90, S 3, 160-162
- 3) Candotti P., La protezione sanitaria dell'allevamento suinicolo, 193; 2004
- 4) Mundt H.C., Parasitol. Res. 98, 167-175; 2006
- 5) Lindsay D.S., Coccidia and other protozoa, in Diseases of swine, Straw B., 861-873; 2006
- 6) Torres A, Prevalence survey of *I. Suis* in twelve European countries, Proceedings IPVS 2004, 243; 2004
- 7) Henriksen S.A., Christensen J.P.B, Yvone P., Coccidiosis in piglets in Denmark. Shedding oocysts of *Isospora suis* in relation to the age of the host. Coccidia and Intestinal Coccidimorphs, INRA, pp 489-492; 1989
- 8) Nierstrath M., Takla M., Joachim A and Dausgshies. The role of *Isospora suis* as a pathogen in Conventional Piglet Production in Germany J. Vet. Med. B. 49,176-180; 2002
- 9) Gualdi V., Vezzoli F, Luini M, Nisoli L.: Il ruolo di *Isospora suis* nell'eziologia della diarrea dei suinetti lattanti. Atti XXIX Meeting Annuale SIPAS ,Salsomaggiore Terme p.54
- 10) Blagburn B.L., Boosinger T.R., Powe T.A., Experimental *Isospora suis* infections in miniature swine, Vet. Parasitol., 343-7; 1991





*Prevenzione e Terapia*

100%

150<sup>o</sup>  
ANNIVERSARIO  
UNITÀ D'ITALIA

Made in Italy

**FATRO, farmaci e vaccini  
studiati, testati e prodotti in Italia**



*la salute animale per la salute dell'uomo*

# il Riferimento nella Prevenzione in Salute Animale

[www.hipra.com](http://www.hipra.com)



# DIFENDIAMO L'ECCELLENZA MADE IN ITALY.

Solo la metà degli allevamenti di suini in Italia è "Aujeszky Free".



La vaccinazione è l'elemento fondamentale per il piano di Controllo ed Eradicazione della malattia di Aujeszky.





# JANSSEN ANIMAL HEALTH

Divisione della Janssen-Cilag Spa

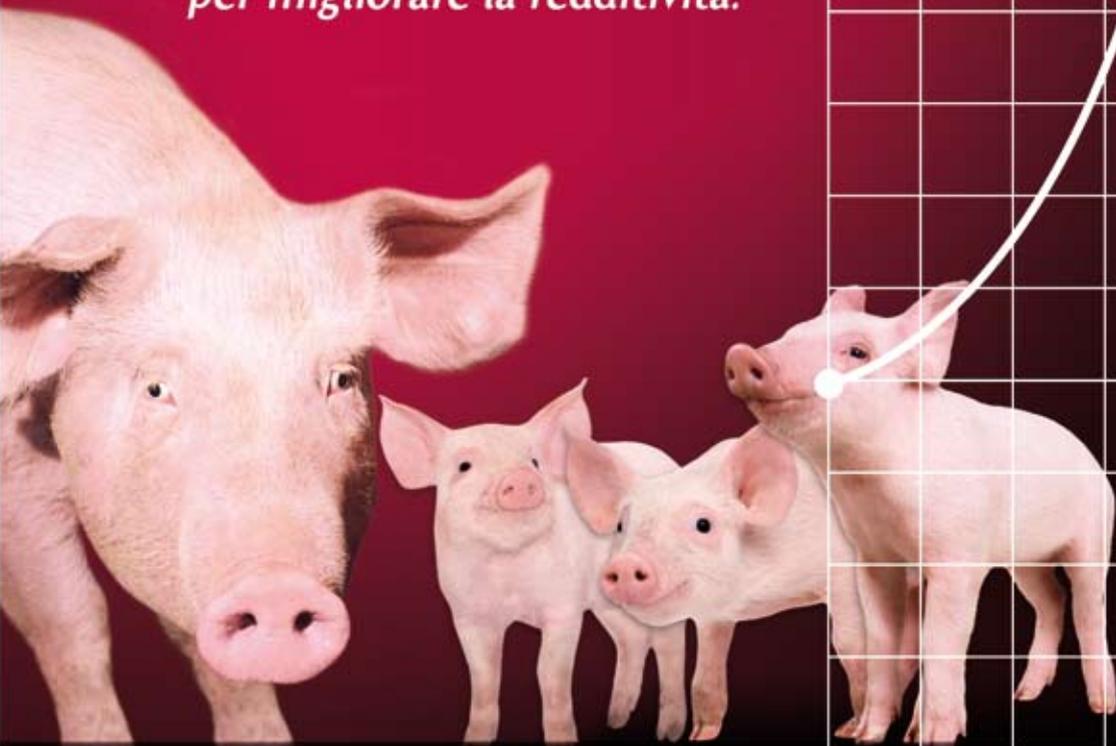
MILANO • Via Michelangelo Buonarroti, 23 • 20093  
Cologno Monzese • Tel. 0225101 • Fax 022510500

**JANSSEN**  
ANIMAL HEALTH

MALATTIE ASSOCIATE A PCV2

# Sorridete!

*Il vaccino Merial contro il PCV2  
vi offre una opportunità in più  
per migliorare la redditività.*



**Vaccino Merial**  
per *scrofe* e *suinetti* contro il **PCV2**



**NUOVA INDICAZIONE SUINETTO**

Chiedi al Tuo 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: [merialItalia@merial.com](mailto:merialItalia@merial.com) - [www.merial.com](http://www.merial.com)

© Copyright 2011. Tutti i diritti riservati.



A large pig and four smaller piglets are swimming underwater in clear blue water. The pig is in the center, looking towards the camera with its front paws raised. The piglets are swimming around it, some looking towards the camera. Bubbles are visible around the pigs, suggesting they are breathing underwater. The lighting is bright, creating a serene and somewhat surreal atmosphere.

PERCHÉ RESPIRARE SIA LA COSA PIÙ FACILE DEL MONDO.



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.



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 Alfarsosa 4  
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:  
+39 0522 640711

FAX:  
+39 0522 649757  
+39 0522 640716

info@treivet.com  
www.treivet.com



# Prodotti VIRBAC

PER LA RIPRODUZIONE

*Ottimizza la produttività  
e la resa del tuo allevamento!*



VIRBAC S.r.l.  
Via Caldera, 21 - 20153 Milano  
Tel. 02.4092471 - Fax 02.40924777  
[www.virbac.it](http://www.virbac.it) e-mail: [virbac@virbac.it](mailto:virbac@virbac.it)

**Virbac**  
SALUTE ANIMALE