Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS nel 2012 si svolgono grazie al contributo di:

• BAYER SANITÀ ANIMALE

• BOEHRINGER INGELHEIM

• CALIER ITALIA

• CEVA SALUTE ANIMALE

• CHEMIFARMA

• DOX-AL ITALIA

• ELANCO ANIMAL HEALTH

• ESTEVE VETERINARIA

• FATRO

• GELLINI FARMACEUTICI

• HIPRA ITALIA

• HUVEPHARMA

• INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TRE I

• IZO

• MERIAL ITALIA

• MSD ANIMAL HEALTH

• NOVARTIS ANIMAL HEALTH

• PFIZER ITALIA

• SINTOFARM

• VIRBAC

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI 2012

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2012

XXXVIII MEETING ANNUALE

Parma

In copertina: *Animal in Pink,* Nicoletta Belletti, www.bellettinicoletta.it

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2012

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XXXVIII Meeting Annuale, Parma, 22-23 Marzo 2012.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2012.

ISBN 978-88-903311-4-5

INDICE

Prefazione ..... p. 21

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

NOVITÀ E LINEE DI TENDENZA NELLA NUTRIZIONE DEI SUINI

Reggio Emilia, 15 Aprile 2011

Baricco G. Novità e linee di tendenza nella nutrizione dei riproduttori suini ..... p. 25

Cerati C. L'alimentazione del suino da ingrasso: novità e tendenze? ..... p. 41

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

SU ALCUNI PROBLEMI "VECCHI", ANCORA "NUOVI"

Salsomaggiore Terme (PR), 30 Settembre 2011

Russo V. Tecniche e strumenti per la valutazione della carcassa suina ..... p. 49

Caleffi A. Management dell'allevamento in funzione della classificazione Europ ..... p. 56

Wendt M. Fattori di rischio e prevenzione della zoppia nel suino ..... p. 60

ATTI DEL XXXVIII MEETING ANNUALE

Parma, 22-23 Marzo 2012

TAVOLA ROTONDA

Farmer C. Fattori che influenzano la produzione di latte e lo sviluppo mammario nel suino ..... p. 73

TAVOLA ROTONDA
PATOLOGIA COMPORTAMENTALE

Dalmau Bueno A., Velarde A. - *S*tereotipie e il sistema di valutazione Welfare Quality® per i suini ..... p. 81

Edwards S. Cause e controllo del *Tail biting* nei suini ..... p. 83

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Riemensperger A.V., Paodan D., Pasteiner S.
Una sostanza permeabilizzante per aumentare l'efficacia degli acidi organici ed aldeide cinnamica ..... p. 89

Calisesi L., Persona P.
Valutazione delle lesioni podali di scrofe a seguito di variazioni dietetiche mediante una indagine clinica di campo ..... p. 98

Mazzoni C., Sabbioni A., Bertini E., Menozzi A., Piancastelli C., Catelli E., Zanardelli P., Zambini E.M., Saleri R., Superchi P.
Studio preliminare sull'utilizzazione della caffeina nelle scrofe al parto ..... p. 105

Baricco G., Massa M.
Risorse web gratuite per il swine enthusiast ..... p. 110

Baldo G.L., Boeri F., Borla P., Minelli G, Guarini C.P.B.
Analisi del ciclo di vita di un vaccino per il controllo dell'odore di verro nell'allevamento di suini maschi ..... p. 115

Vio D., Ustulin M., Di Giusto T., Deotto S., Drigo I., Tonon F., Giorgiutti M., Conedera G., Cocchi M.
Sensibilità agli antimicrobici in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da suino ..... p. 123

Galletti E.
Indagine epidemiologica sulla colonizzazione da *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (Mrsa) nell'allevamento suino ..... p. 131

Zoppi S., Garrone A., Rossi F., Ferraro G., Sona B., Giorgi I., Goria M., Tron S., D'Errico V., Alborali G., Zanoni M.G., Dondo A., Baricco G.
Mycobacterium avium subsp. *avium*: forme generalizzate di tubercolosi aviare in un allevamento suino a gestione multisito ..... p. 142

Costarelli S., Maresca C., Faccenda L., Crotti S., Tentellini M., Cucco L., Panzieri C., Mariotti C., Sensi M., Magistrali C.F.
Studio sulla prevalenza di *Brucella suis* nelle popolazioni di suidi domestici e selvatici dell'Umbria ..... p. 152

Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Maioli G., Biasi G., Dottori M., Merialdi G.
Resistenza agli antibiotici di ceppi di E*scherichia coli* F4+ isolati dal suino nel periodo 2002-2011 ..... p. 160

Sala V., Musella C., Costa A., Gusmara C.
Indagine sulle cause di riforma delle scrofe nel "sistema italiano" e correlazione con le scelte gestionali ..... p. 169

Vezzoli F., Borella L., Santoro E., Luppi A., Bonilauri P., Negri M., Luini M.
Indagini su *Haemophilus parasuis* come causa di riforma anticipata nei suini in accrescimento ..... p. 175

Ardigò P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Luppi A., Gherpelli Y., Merialdi G., Volta A., Gnudi G., Saleri R., Borghetti P., Martelli P.
Studio delle manifestazioni cliniche, delle modificazioni anatomiche e del pattern infiammatorio citochinico nel liquido bronco-alveolare in suini affetti da malattia respiratoria acuta spontanea da *Actinobacillus pleuropneumoniae*: implicazioni terapeutiche ..... p. 187

Bonilauri P., Carra E., Biasi G., Bergamini F., Corpus F., Magistrali C., Luppi A., Gherpelli Y., Rugna G., Cucco L., Dottori M, Merialdi G.
Genotipizzazione di ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati in Italia attraverso il sequenziamento multilocus (*multilocus sequence typing*) ..... p. 205

Lonardi C., Scollo A., Contiero B., Gottardo F.
Il benessere animale negli allevamenti di suini in Veneto: opinione ed aspettative degli allevatori ..... p. 216

Baricco G., Piovano R.
Efficacia del bromuro di potassio somministrato per via orale nel controllo delle interazioni sociali dei suini ..... p. 225

Dotti S., Guadagnini G., Salvini F., Razzuoli E., Ferrari M., Alborali GL, Amadori M.
Valutazione dello sviluppo della risposta immunitaria al virus PRRS: studio di campo ..... p. 232

Sandri G., Giovanardi D., Pesente P., Sperati-Ruffoni L., Perini F., Rossi G.
Acclimatamento delle scrofette nei confronti della PRRS; confronto di quattro differenti metodologie per la verifica della presenza di PRRSV e altri patogeni respiratori nei gruppi di rimonta ..... p. 236

Boriosi G., Gugliotta A., Lasagna C., Foni E., Chiapponi C., Dottori M., Vila T., Leotti G.
Descrizione di un focolaio di influenza (A/H1N1) in un allevamento suino da ingrasso ..... p. 242

Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Angelini R., Fabbri D., Massi P.
Indagine sierologica nei confronti dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2 del virus influenzale in cinghiali *(Sus scrofa)* abbattuti in provincia di Rimini p. 256

Canelli E., Bresaola M., Lavazza A., Giacomini E., Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Moreno A., Cordioli P.
Valutazione della circolazione di porcine Bocavirus-like virus (PBo-likeV) in allevamenti suini in Nord Italia p. 261

Canelli E., Lavazza A., Bresaola M., Barbieri I., Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Moreno A., Cordioli P.
Astrovirus: possibile implicazione nell'eziologia di enterite nel suino p. 267

POSTER

Cocchi M., Di Giusto T., Ustulin M., Deotto S., Drigo I., Conedera G., Vio D.
Tipizzazione fenotipica dei ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti e meticillino sensibili isolati da suino: sensibilità agli antimicrobici, biotipizzazione e studio del biofilm p. 277

Costarelli S., Gavaudan S., Sensi M., Marilungo L., Morelli M.S., Paniccià M., Antolini A., D'Angelo G., Barchiesi F., Magistrali C.F.
Circolazione di *Brucella suis* negli allevamenti di cinghiali nella regione Marche p. 284

Cevidalli A.E, Foresti F.
Efficacia comparativa di vaccini verso *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 p. 290

PREMIO GUADAGNINI

Ferrari L.
Vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and exposure to natural infection by a heterologous field isolate: immune efficiency and neuroendocrine response
in conventional pigs p. 303

NOVARTIS
ANIMAL HEALTH

Curiamo i vostri animali al meglio **perchè rendano al massimo.**

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali. Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari in grado di combattere le più importanti patologie degli animali da reddito ed assicurare loro un ambiente di vita più salubre.
Animali in buona salute, più rilassati, producono di più e meglio, grazie alle soluzioni terapeutiche d'avanguardia di Novartis Animal Health, sviluppate nel rispetto dei più rigidi standard di eccellenza qualitativa per garantire efficacia, tollerabilità, sicurezza. E massima resa.

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

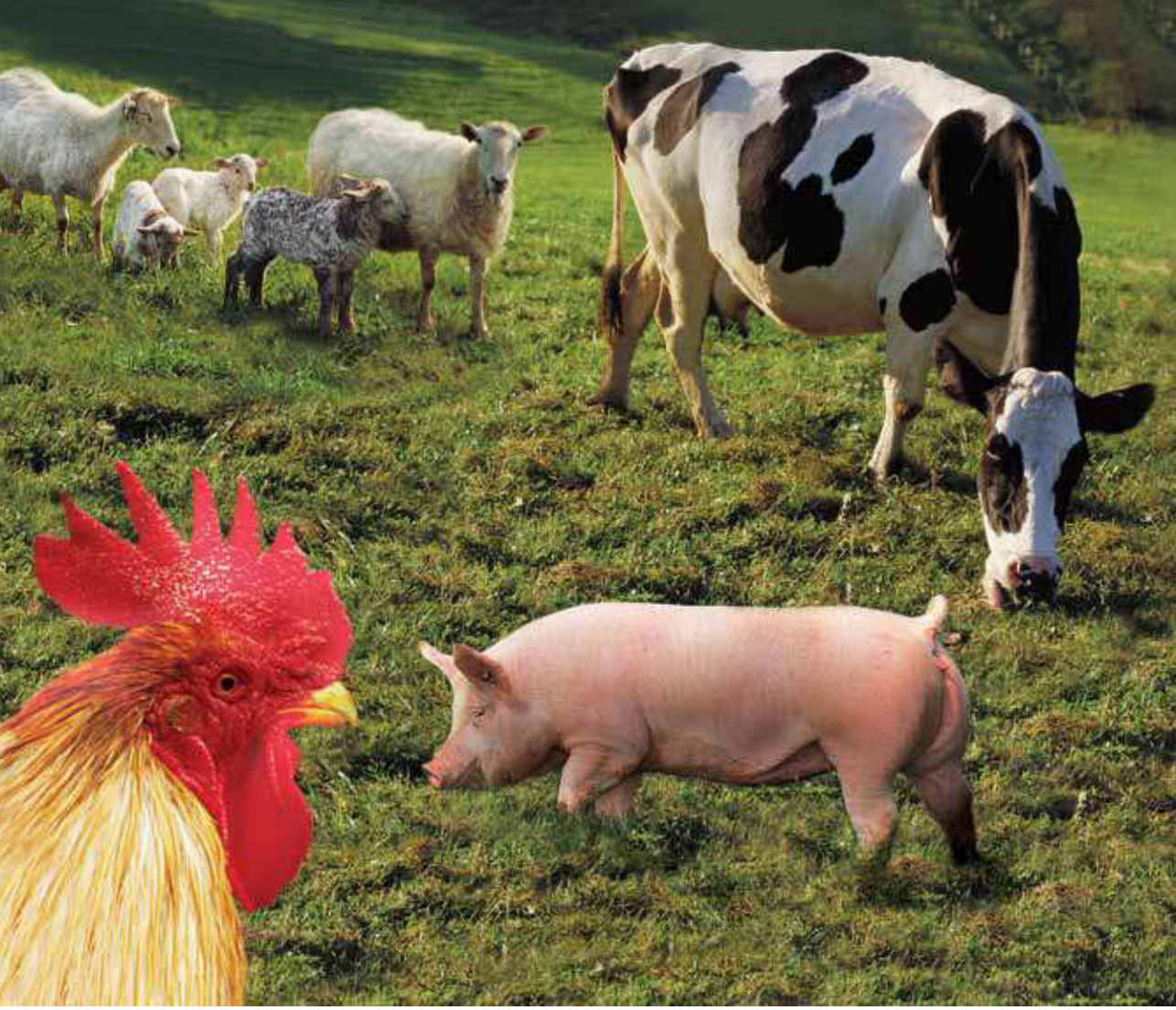
Boccata d'aria

©scia-com.it - ITSWIPPX00003

Elanco™

Eli Lilly Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731
50019 Sesto Fiorentino (FI)

Per saperne di più visita
www.elanco.com



La soluzione giusta per ogni specie di problema

www.vetclub.it

BAYER

Bayer HealthCare
Animal Health

NUMEROVERDE
800-015121

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO) - Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512714 - www.fatro.it - e-mail: info@fatro.it

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

Ceva Vetem è oggi

Ceva Salute Animale

Attiva in oltre 110 paesi

11 centri di ricerca e sviluppo

Insieme, oltre la salute animale

Ceva Salute Animale S.p.A.
Viale Colleoni 15 - 20864 Agrate Brianza (MB)
www.ceva-italia.it

Cavriago Plant
Via Leopardi, 2/C - 42025 Cavriago (RE)

Vetem S.p.A.
Lungomare Pirandello, 8 - 92014 Porto Empedocle (AG)

the world
of chemifarma

chemifarma® S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Il tuo partner in terapia veterinaria e nutrizione

VETERINARY THERAPY
TERAPIA VETERINARIA
VT

Terapia Veterinaria

ANIMAL NUTRITION
NUTRIZIONE ANIMALE
ANA

Nutrizione Animale

Linea Biosicurezza

Linea Disinfettanti

Distributore esclusivo per l'Italia:

DOPHARMA INTERNATIONAL
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**

L'azienda italiana che vola nel mondo.

Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al e stanno alla base di tutti i suoi brevetti e tecnologie riconosciute a livello internazionale.
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!

dox-al

doxal.com

Dox-al Italia S.p.A.
Via Mascagni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

ESTEVE veterinaria

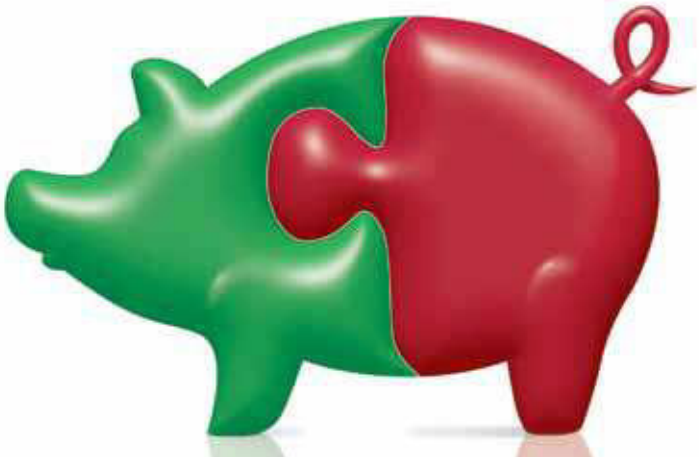
Innovazione e Ricerca
al servizio della produzione animale

- **Soddisfazioni per i professionisti**
- **Benessere per gli animali**
- **Rispetto per l'ambiente**

ESTEVE S.p.A.
Via Ippolito Rosellini, 12, 1° piano
20124 - Milano (Italia)
Tel.: 02 699.64.224
Fax: 02 699.64.250
e-mail: estevespa@esteve.es
www.veterinariaesteve.com

Boehringer Ingelheim

FLEX



Efficacia senza compromessi

CircoVIRUS

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

Chiedi al tuo veterinario

PREFAZIONE

E' con vero piacere che ho accettato il compito, assegnatomi dal Presidente, di introdurvi al trentottesimo congresso annuale. La SIPAS, ha infatti accompagnato e caratterizzato la mia vita professionale fin dai suoi primi passi, come penso sia successo a molti di voi, e personalmente vivo il congresso come momento di bilancio della vita professionale svolta nell'anno passato e occasione per redigere un programma dell'attività futura.

Il 2011 non può essere considerato un anno facile: non lo è stato per l'economia mondiale e la suinicoltura non ha fatto eccezione. La crisi economica che ha investito l'Europa ha comportato un progressivo contrarsi degli utili delle aziende, che ha finito per tradursi in una minore disponibilità di fondi da destinarsi a investimenti in ambito tecnico e scientifico, tendenza che per altro si andava configurando già da alcuni anni. Parallelamente stiamo assistendo a una maggiore rigidità da parte dello Stato, attraverso i diversi Ministeri preposti, nell'erogare risorse economiche al settore ricerca: molti fondi che in passato erano destinati a indagini di carattere applicativo sono stati progressivamente eliminati o fortemente ridimensionati. A questo, si aggiunge un problema culturale: da qualche anno si osserva, infatti, la tendenza a favorire la ricerca diretta alle problematiche della filiera nel suo insieme, rispetto a quella nell'ambito della produzione primaria. Questa tendenza è particolarmente evidente, per chi, come me, si trova a operare all'interno di un Istituto Zooprofilattico Sperimentale: nel corso degli anni il peso relativo delle diagnostiche è via via diminuito in termini di importanza, a fronte di una crescita di altri settori, come quello legato al controllo degli alimenti.

Questo interesse alle problematiche che coinvolgono tutta la filiera si è tradotto nei fatti in una maggiore disponibilità economica per ricerche destinate allo studio delle zoonosi rispetto a quelle dirette a indagare le malattie proprie del suino. Nel tempo, questo ha spinto molti ricercatori a lavorare in modo privilegiato su argomenti di sanità pubblica, rispetto ad argomenti di sanità animale. Tuttavia, la produzione primaria merita un'attenzione ad essa dedicata da parte della ricerca: lo studio delle patologie che presentano un impatto significativo per l'allevamento suino ad esempio, costituiscono di fatto un sostegno ad un settore produttivo che è parte integrante della nostra cultura e tradizione.

Lo studio dei patogeni della produzione primaria permette, inoltre, di istaurare un rapporto di fiducia con i veterinari responsabili della gestione sanitaria delle aziende, traducendosi in una maggiore capacità nell'individuare precocemente le problematiche che interessano la sanità pubblica. D'altra parte, la conoscenza dettagliata del sistema produttivo si rivela utile nel disegnare misure di controllo appropriate e significative.

I momenti di crisi come quello che stiamo vivendo possono offrire anche una preziosa opportunità per interrogarci sul senso e sul ruolo delle nostre attività, valutandone costi e benefici: avendo risorse più contenute, siamo infatti costretti ad interrogarci su come investirle al meglio.

La nostra Società rappresenta un momento di confronto e di riflessione tra operatori del settore che si rivela molto preziosa in questo momento storico: nella grande disponibilità di informazioni da parte di diversi canali, il ruolo e il senso delle società scientifiche è infatti quello di promuovere il confronto e la collaborazione tra colleghi che operano nello stesso settore in ambiti differenti, ruolo che la SIPAS ha sempre interpretato con successo. L'apertura nei confronti del nuovo e l'accoglienza ai giovani ricercatori, sulla

base di un criterio meritocratico, rappresentata dal Premio Guadagnini, costituisce un elemento centrale e caratterizzante della nostra Società.
Il mio augurio per il 2012 è che quindi questi elementi di serietà scientifica, di innovazione e accoglienza verso i colleghi che sia affacciano alla professione, sia mantenuto ed esteso anche nei prossimi anni.
Poco mi resta da aggiungere per introdurre questo volume degli ATTI; come avrete notato, abbiamo spesso affrontato aspetti gestionali nel corso delle diverse giornate di studio, proprio per valorizzare questa componente che caratterizza la SIPAS rispetto ad altre società scientifiche.
Ringrazio, a nome di tutto il Consiglio Direttivo, le Industrie di Salute Animale, che hanno continuato a sostenere le nostre attività nel corso di quest'anno, confermando un rapporto di stima che ci consente di affrontare con serenità i nostri compiti nell'anno a venire, e i Relatori, che hanno voluto condividere il loro lavoro con tutti gli iscritti, fornendo un importante contributo alla nostra crescita culturale.
Ringrazio infine, tutti i membri del Consiglio Direttivo, per la serietà e la fantasia dimostrate nell' organizzazione delle le attività della Società; lavorare con questi colleghi è stata per me una occasione preziosa.
A tutti gli iscritti un sentito ringraziamento per avere contribuito e partecipato alle Iniziative della Società, rendendola viva e attiva.

Dr. ssa Chiara Magistrali

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

NOVITÀ E LINEE DI TENDENZA NELLA NUTRIZIONE DEI SUINI

Reggio Emilia, 15 Aprile 2011

NOVITÀ E LINEE DI TENDENZA NELLA NUTRIZIONE DEI RIPRODUTTORI SUINI

GIUSEPPE BARICCO

Medico Veterinario Libero Professionista, Torino
giuseppe@baricco.it

INTRODUZIONE

Volendo identificare in modo chiaro alcune novità e linee di tendenza nella nutrizione dei riproduttori suini è opportuno, stante la vastità della materia, segmentare l'argomento in alcuni sottocapitoli.
In particolare si può approfondire su:

a) quali siano stati i temi più frequentemente affrontati nella ricerca internazionale negli ultimi anni,
b) esperienze concrete condotte in Italia alla luce delle specificità della nostra situazione produttiva, ed infine
c) confrontare, su basi omogeneamente comparabili, le raccomandazioni alimentari delle maggiori Società nazionali ed internazionali impegnate nella selezione e nel commercio della genetica suina.

I TEMI DELLA RICERCA INTERNAZIONALE

Si è effettuata una semplice richiesta su due dei databases più diffusi, PubMed e CABi abstracts, digitando semplicemente le parole "sows and feed".
L'analisi dei temi nutrizionali trattati negli articoli recensiti dei due databases, con riferimento agli anni 2011, 2010 e 2009 è risultato il seguente:

Tabella 1. *Percentuale di articoli pubblicati, suddivisi per argomenti, ottenuti con le parole chiave "sows" e "feed", periodo 2009/2011*

	PubMed (n=56)	CABi (n=54)
Vitamine	7.1	5.5
Aminoacidi	8.9	14.8
Lipidi alimentari, influenza degli acidi grassi	18.0	9.3
Additivi vari	16.0	22.2
Micotossine	12.5	3.7
Ambiente, benessere, tipo di somministrazione	5.3	9.3
Assunzione alimentare in lattazione	5.3	7.4
Ingredienti macro dei mangimi	8.9	1.8
Caratteristiche del mangime di gestazione (++ fibra)	18.0	26
	100.0	100.0

Come si vede, non vi è un tema che in significativa maggioranza abbia attirato l'attenzione degli studiosi negli ultimi due anni: la ripartizione degli argomenti è infatti abbastanza "piatta".
Tuttavia, sia su PubMed che su CABi, vi è una notevole massa di riferimenti al tema della fibra in gestazione, e dei suoi effetti sullo svolgersi del parto e sulla successiva lattazione e copertura.

Selezione di articoli pubblicati
Peltoniemi et al.,(2010) documentano come il fornire a partire dall'estro un mangime ricco in fibre (DE = 2630 Kcal/kg, F) a volontà rispetto ad una tradizionale somministrazione a razione (2,5 kg/ giorno per 3180 Kcal DE/kg, R) su un totale di 926 gravidanze controllate non abbia influenzato né la fertilità, né l'intervallo svezzamento-calore, e neppure il numero di nati vivi e nati morti. Fornito poi a volontà a entrambi i gruppi un mangime da lattazione, si è verificato che il gruppo di controllo R ha svezzato più suinetti (9,7 vs 9,4, P<0,01) mentre i suinetti del gruppo a volontà F sono risultati più pesanti allo svezzamento (8,8 kg vs 8,0, P<0,05).
Guillemet et al., (2010) hanno investigato l'effetto di un mangime al 3,5% di fibra (3F) e di uno al 12,8% (12F) fornito durante la prima gestazione a scrofette (LWxLdr) in quantità da apportare la stessa energia giornaliera sulla velocità di adattamento al successivo mangime da lattazione, mostrando che il gruppo 12F andava a consumare il mangime da lattazione (soglia: almeno per il 50% della razione giornaliera) ben 20 giorni prima del gruppo 3F. La crescita dei suinetti non è stata comunque influenzata dai trattamenti, mentre la perdita di spessore di grasso dorsale in lattazione è risultata più elevata per il gruppo 12F. Concludono che un mangime alto in fibra rende più semplice e spontaneo il passaggio al mangime di lattazione.
Oliviero et al., (2009) hanno somministrato a 81 scrofe nelle tre settimane prima del parto un mangime al 3,8% di fibra (3F), oppure al 7% (7F). Hanno misurato la motilità intestinale osservando uno "score" di aspetto esteriore delle feci, trovandolo significativamente diverso, con deiezioni più formate e meno compatte per il gruppo 7F: evenienza anche correlabile con maggior consumo di acqua osservato nel gruppo 7F. Il peso dei suinetti in quinta giornata è risultato superiore per il gruppo 7F. Gli Autori concludono che la fibra fornita prima del parto è utile per stimolare la motilità intestinale, senza influenzare i dati di bilancio energetico degli animali.
Veum et al., (2009) hanno fatto consumare 0,3 kg di paglia macinata oltre alla normale razione di gestazione ad una frazione di un totale di 320 scrofe, le quali sono state monitorate per tre successivi cicli produttivi, per un totale effettivo di 708 parti, suddivisi in controllo (C) , e gruppo paglia-aggiunta (P). Il gruppo P in gestazione ha dunque consumato la dose progettata di mangime (1,95 kg, come il gruppo C), più 0,3 kg di paglia macinata, mentre il mangime di lattazione era uguale tra i gruppi.
Sulla media dei tre parti, il gruppo P ha partorito e svezzato + 0,51 suinetti/ciclo (P<0,04), con un peso totale della nidiata superiore sia al parto (+kg 0,87) che allo svezzamento (+ kg 3,59, P=0,01).
Il consumo di mangime di lattazione è stato superiore (P=0,01) per il gruppo P. Non vi sono state differenze significative sui dati di fertilità, sull'intervallo svezzamento-calore, sulla percentuale ed il tempo di riforma anticipata.
Quesnel et al., (2009) hanno fornito a due gruppi di 9 scrofe ciascuno, a partire dal 26°

giorno di gestazione, rispettivamente un mangime al 2,8% di fibra (3F) ed uno all'11% (11F), in quantità tali da apportare giornalmente la stessa energia. Dopo il parto entrambi i gruppi hanno avuto a disposizione ed a volontà lo stesso mangime da lattazione. Il pareggiamento a 12 suinetti/scrofa è stato eseguito a 48 h. dal parto. Durante la gestazione, il peso ed il grasso dorsale delle scrofe non è stato influenzato dal trattamento. Durante la lattazione, le scrofe 11F hanno consumato 0,94 kg di mangime in più al giorno rispetto alle 3F ($P<0,02$) e i loro suinetti hanno avuto un tasso di crescita superiore rispetto alle 3F ($P=0,03$).
Il calo peso e la riduzione dello spessore del lardo in lattazione non è stato diverso tra i due gruppi.
Le concentrazioni ematiche di leptina sono risultate negativamente correlate con l'assunzione alimentare in lattazione ($P<0,05$), mentre l'evoluzione di altri controlli sui parametri ematici, tra cui glucosio, NEFA e lattato non sono risultati correlabili al trattamento.
Concludono che il maggiore appetito in lattazione susseguente al consumo in gestazione di un mangime alto in fibre non è da correlare a variazioni nel metabolismo del glucosio e dell'insulina, mentre può essere parzialmente collegato al variare del titolo in leptina.
Il maggiore consumo di mangime da parte delle scrofe 11F non è andato a ridurre il loro ricorso alle riserve corporee in lattazione, ma è stato interamente utilizzato nella maggiore crescita della nidiata.

Costo del trattamento

L'esame complessivo dei dati sperimentali indica, insieme ad una generale attenzione del mondo della ricerca a questo tema, una linea di tendenza abbastanza chiara a favore della somministrazione durante la gestazione delle scrofe di dosi supplementari di fibra (generalmente sotto forma di fibra fermentescibile, come quella delle polpe di barbabietola, ma anche di semplice paglia di frumento), in maniera ben più ampia di quanto attualmente non si faccia, formulando in modo da raggiungere un tenore di fibra grezza nella razione per le gestanti intorno al 10%.
Gli effetti più tangibili si misurerebbero su:

1. Maggiore e più facile consumo di mangime in lattazione
2. Maggiore crescita dei suinetti in lattazione, con maggior peso allo svezzamento.

Un problema applicativo, però, risiede nei costi di questa tecnica, stante che la cellulosa non è disponibile sul mercato a costo zero.
Per questo si confrontano i costi di un mangime standard da gestazione (15,5% PG, 5% FG, 3100 Kcal DE, 0,7% lys, costo € 0,27/kg) da fornirsi alla dose media di 2,2 kg al giorno (apportante: 340 gr di proteina, 6800 Kcal DE, e 15,5 gr di lisina) con un altro, "arricchito" di dosi supplementari di polpe di barbabietola e di paglia di frumento in modo da raggiungere un livello di fibra grezza del 10%. Il mangime che deriva da questa operazione di "diluizione fibrosa" (13,8% PG, 9,8% FG, 2900 Kcal DE, 0,6% lys, costo 0,255/kg), per dare gli stessi nutrienti al giorno per scrofa dovrà essere fornito alla dose di 2,40 kg/ giorno (apporti: 330 gr di proteina, 6900 Kcal DE, e 14,4 gr di lisina al giorno).
Il costo di mantenimento, dunque, sarà di (0,27 x 2,2) = 0,594 €/giorno per il mangime tradizionale e di (0,255 x 2,4) = 0,612 €/giorno per il mangime "fibroso".
I costi considerati sono quelli correnti nella prima settimana di Aprile 2011:

Tavola 1. Mangimi standard e fibrosi per scrofe in gestazione

FORMULA : 1 SCROFE STANDARD

300	MAIS IBRIDO $	30.500	24000	7320
370	GRANO T CRUSCHELLO $	25.000	15500	3875
308	ORZO 65 PS $	20.000	23500	4700
205	SOIA FE 44$	9.500	34000	3230
868	CMV	5.000	100000	5000
204	COLZA FE 35 >$	5.000	23500	1175
438	BIETOLA POLPE ESS. $	4.000	2250	900
600	STRUTTO	1.000	85000	850

COSTO AL kg euro	100.000	0,27050

NUTRIENTE	STQ	SSS	NUTRIENTE	STQ	SSS
1 SS	88.055	100.000 %	32 Mg	2.124	2.413 g
2 Acqua	11.945	.000 %	33 Zn	236.175	268.213 mg
3 PG	15.404	17.494 %	34 Cu	41.115	46.692 mg
4 GG	4.041	4.589 %	35 Lis	7.135	8.103 g
5 FG	5.826	6.616 %	36 Met	2.552	2.898 g
6 CG	6.198	7.039 %	37 Met&Cis	5.481	6.224 g
7 NDF	20.427	23.199 %	38 Tre	5.577	6.333 g
13 Amido	33.081	37.569 %	39 Tri	1.790	2.032 g
14 Amido&Zucc	36.951	41.964 %	40 Arg	9.381	10.653 g
21 ED Suini c	3093.420	3513.054 cal	41 Leu	12.088	13.728 g
22 EN Suini c	2163.319	2456.782 cal	42 Ileu	6.100	6.927 g
23 EN Suini M	9.060	10.289 MJ	43 Val	7.731	8.780 g
24 Ca	9.502	10.790 g	44 Lis dS	5.736	6.514 g
25 Pt	7.679	8.721 g	45 Met dS	2.223	2.525 g
26 Pv	1.587	1.803 g	46 Met&Cis dS	4.629	5.257 g
27 Na	2.104	2.390 g	47 Tre dS	4.467	5.073 g
28 Cl	2.224	2.525 g	48 Tri dS	1.441	1.636 g
29 K	6.394	7.262 g	59 Ac.linolei	1.515	1.721 %
30 mEq	163.373	185.535 mEq			

FORMULA : 2 SCROFE FIBROSE

300	MAIS IBRIDO $	24.400	24000	5856
370	GRANO T CRUSCHELLO $	20.000	15500	3100
308	ORZO 65 PS $	16.000	23500	3760
205	SOIA FE 44$	7.600	34000	2584
868	CMV	4.000	100000	4000
204	COLZA FE 35 >$	4.000	23500	940
438	BIETOLA POLPE ESS. $	17.600	22500	3960
600	STRUTTO	.800	85000	680
585	PAGLIA	5.600	12000	672

COSTO AL kg euro	100.000	0,25552

NUTRIENTE	STQ	SSS	NUTRIENTE	STQ	SSS
1 SS	88.044	100.000 %	32 Mg	2.133	2.423 g
2 Acqua	11.956	.000 %	33 Zn	191.100	217.051 mg
3 PG	13.791	15.664 %	34 Cu	34.332	38.994 mg
4 GG	3.492	3.966 %	35 Lis	6.163	7.000 g
5 FG	9.809	11.141 %	36 Met	2.219	2.520 g
6 CG	5.832	6.624 %	37 Met&Cis	4.676	5.311 g
7 NDF	25.556	29.027 %	38 Tre	4.879	5.541 g
13 Amido	26.609	30.222 %	39 Tri	1.547	1.757 g
14 Amido&Zucc	30.713	34.884 %	40 Arg	7.836	8.900 g
21 ED Suini c	2914.416	3310.181 cal	41 Leu	10.265	11.659 g
22 EN Suini c	1978.335	2246.985 cal	42 Ileu	5.323	6.046 g
23 EN Suini M	8.315	9.444 MJ	43 Val	6.755	7.672 g
24 Ca	9.142	10.383 g	44 Lis d	4.820	5.475 g
25 Pt	6.346	7.208 g	45 Met dS	1.892	2.149 g
26 Pv	1.281	1.455 g	46 Met&Cis dS	3.849	4.371 g
27 Na	1.956	2.222 g	47 Tre dS	3.699	4.201 g
28 Cl	1.837	2.086 g	48 Tri dS	1.203	1.366 g
29 K	5.389	6.121 g	59 Ac.linolei	1.212	1.377 %
30 mEq	146.717	166.640 mEq			

Il mangime fibroso viene consigliato per gli ultimi tre mesi di gravidanza.
Pertanto la differenza di costo di mantenimento (€ 0,018/giorno/scrofa) , equivalente ad un costo per ciclo produttivo di (0,018 x 90) = € 1,62 per scrofa e per parto, a fronte dei vantaggi reclamati dalla ricerca internazionale sembrerebbe meritare attenzione, in particolare da parte di quegli allevatori che

1. Hanno la possibilità tecnica di alimentare con due mangimi diversi le scrofe fino a 25 -30 giorni di gravidanza e le altre in gestazione dai 30 ai 115 giorni
2. Lamentano ricorrenti problematiche relative alla insufficiente assunzione alimentare in sala parto.

ESPERIENZE CONDOTTE IN ITALIA

Un ampio studio pubblicato da *Grattarola et al.,* (2010-2011) conferma anche in Italia l'elevata incidenza di malattie a carico dell'apparato urinario nelle scrofe allevate.
Il 22,8 % dei campioni di urine prelevate in allevamento è risultato positivo all'urocultura, con una netta prevalenza (55 %) della presenza, da solo o in associazione ad altri patogeni, di *Escherichia coli.* L'esame complessivo dei dati ottenuti nella ricerca conferma come l'incidenza delle infezioni urinarie aumenti significativamente con il progredire dell'età degli animali, e sia particolarmente importante durante la fase di lattazione.
Elevata anche la prevalenza di isolamenti effettuati l'anno precedente su scrofe a fine carriera regolarmente macellate:

Tabella 2. *Urocultura positiva in campioni di urine di scrofe* (Grattarola et al., 2010-2011)

	Negative	Positive	Totali
Primipare in gestazione	91% (n=60)	9% (n=6)	100% (n=66)
Primipare in lattazione	79% (n=39)	21% (n=10)	100% (n=49)
Pluripare in gestazione	77% (n=58)	23% (n=17)	100% (n=75)
Pluripare in lattazione	60% (n=36)	40% (n=24)	100% (n=60)
Riformate	70% (n=50)	30% (n=22)	100% (n=72)

In un'altra estesa indagine condotta in Italia negli stessi anni e su un grande numero di capi (690 campioni di urine prelevati in 16 allevamenti) *Gusmara et al. (2010)* hanno evidenziato come complessivamente il 15,2% delle urine prelevate in allevamento presentassero un inquinamento superiore a 10^5 UFC/ml, con elevata variabilità in questa percentuale a seconda dell'allevamento (dal 2,5 al 32%).
Diversamente dall'altro studio, in questo non è stata evidenziata una maggiore frequenza di uroculture positive nelle scrofe in lattazione rispetto alle gestanti, mentre ne è stata confermata la maggiore probabilità negli animali più anziani. Anche in questo caso la netta prevalenza del ceppo implicato fa riferimento a *Escherichia coli* (89,5%)
Un pH delle urine relativamente acido è fattore di freno alla colonizzazione ascendente del tratto urinario, soprattutto se essa avviene a carico di *E.coli,* che notoriamente si sviluppa e moltiplica molto meglio in ambiente vicino alla neutralità o leggermente alcalino.
Pertanto, sulla scorta di precedenti esperienze (*Piumatti et al., 2007)* che avevano mostrato una particolare efficacia nell'ottenimento di un abbassamento del pH urinario della sostituzione del carbonato di calcio con calcio cloruro, una efficacia intermedia del solfato di

calcio ed una efficacia nulla di un pool di acidi organici aggiunti al mangime, si è verificato in condizioni di campo la praticabilità e l'effetto di un mangime da lattazione specificatamente progettato al fine di ottenere un abbassamento del pH urinario.
Il lavoro, svoltosi presso un'Azienda con croniche difficoltà di lattazione conseguenti in elevate perdite di suinetti in sala parto (e nelle cui scrofe al macello era stata evidenziata una presenza di cistite emorragica per il 60% degli animali), è stato oggetto di una tesi di specialità alla Scuola di Specializzazione in Patologia Suina della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino presentata nel 2010 dagli studenti Barbara Simoni e Sandro Risso: non essendosi potuto, per ragioni organizzative dell'allevamento sede della prova, effettuare l'esperimento in contemporanea (somministrando cioè i due mangimi contemporaneamente a gruppi diversi di scrofe), la sperimentazione si è dovuta svolgere in sequenza, esaminando i dati produttivi per due mesi (64 lattazioni controllate, omogeneamente ripartite per classi di età) condotti con il mangime normale (CTRL) e per i due mesi successivi (71 lattazioni controllate, ugualmente ripartite per classi di età) gestiti con quello progettato per acidificare le urine (LpH). Questo fatto ha impedito la pubblicazione dei risultati, che sarebbero stati globalmente contestabili a causa della mancanza di contemporaneità tra tesi e controllo, tuttavia almeno il dato del pH urinario, con prelievo effettuato nell'ultima settimana di lattazione, può certamente essere preso a riferimento: in tabella si riportano i dati globalmente ottenuti nella prova.

Tabella 3. *Effetto di un mangime da lattazione progettato per un basso pH urinario. Misurazioni effettuate in sequenza e non in contemporanea.* Risso e Simoni, 2010, dati non pubblicati.

Parametro	CTRL	L pH
TOTALE SCROFE campionate	64	71
MEDIA SUINETTI NATI vivi	12.96	10.17
MEDIA SUINETTI SVEZZATI	9.48	9.59
MORTALITA' in SALA PARTO %	26.8%	5.7%
MEDIA pH URINARIO RILEVATO	7,41	5,95
INTERVALLO SVEZZAMENTO/CALORE gg	7,94	7.07

Ovviamente il diverso numero di nati (conseguenza del fatto che per il gruppo LpH sono giunte al parto scrofe fecondate nel periodo di massimo calore ambientale) ha influenzato anche il dato della mortalità in lattazione, tuttavia la riduzione dell'incidenza di questo dato appare di un certo interesse.
Il pH urinario vede invece una potente ed incontestabile riduzione, soprattutto se si considera come nel mangime di CTRL fosse già presente una dose efficace di acido benzoico, additivo registrato allo scopo di ridurre il pH delle urine.
Infine anche il dato di riduzione dell'intervallo svezzamento-calore, sia pure in un ambito di generale lunghezza, sembra meritevole di attenzione.
Gli interventi effettuati sui mangimi in prova sono consistiti nella riduzione od eliminazione di tutti i fattori alimentari caratterizzati da attività antiacida (calcio carbonato, bicarbonato di sodio, solfato di magnesio) e dalla loro sostituzione, per quanto riguarda gli apporti di calcio, con una fonte di cloruro di calcio microincapsulato (NutriCab, Soda Ingredients) e con solfato di calcio, conformemente a quanto già osservato nella citata sperimentazione del 2007.

Tabella 4. *Composizione ed analisi calcolata dei mangimi utilizzati.* Risso e Simoni, 2010, dati non pubblicati.

CTRL	**%**	**LpH**	**%**
Mais	28,5	Mais	29,1
Polpe di bietola	4	Polpe di bietola	4
Crusca	11,6	Crusca	11,6
Orzo	28	Orzo	28
Soia	14,5	Soia	14,5
Calcio Carbonato	1,2	Calcio Carbonato	0,5
Fosfato monocalcico	0,6	Fosfato monocalcico	0,6
Olio Soia	1,5	Olio Soia	1,5
Aringa	2,5	Aringa	2,5
Lino estruso	2,5	Lino estruso	2,5
Cicoria	2	Cicoria	2
Integratore vit.	0,5	Integratore vit.	0,5
Silimarina	0,1	Silimarina	0,1
Sale	0,3	Sale	0,3
Bicarbonato di Na	0,3	Lisina	0,1
Lisina	0,1	Acido Benzoico	1
Acido Benzoico	1	Calcio Solfato	0,5
Magnesio solfato anidro	0,1	Nutri Cab®	0,5
ANALISI CALCOLATA		*ANALISI CALCOLATA*	
Proteine gregge %	16,64	Proteine gregge %	16,64
Fibra grezza %	5,58	Fibra grezza %	5,58
DE Kcal/ kg	3211	DE Kcal/ kg	3211
Ca %	0.76	Ca %	0.76
P %	0.6	P %	0.6
Lisina %	0.91	Lisina %	0.91
Met + Cist	0.57	Met + Cist	0.57
Treonina	0.6	Treonina	0.6
Triptofano	0.19	Triptofano	0.19

Costo del trattamento

La modificazione di formula utilizzata genera un aumento del costo del mangime di lattazione stimabile in + 25-30 €/ton, 0,03 €/kg.

Pertanto, su una lattazione di 21 giorni con un consumo giornaliero medio di 6 kg di mangime, il costo per ogni ciclo produttivo sarà di € (21 x 6 x 0,03) = € 3,78 / scrofa / ciclo, mentre nel caso di una lattazione di 28 giorni il costo sarà di (28 x 6 x 0,03) = € 5,04 / scrofa / ciclo.

Questi costi sono coperti da un incremento di svezzati pari a 0,1 suinetto / scrofa, risultato che appare non irraggiungibile e anzi facilmente superabile in quegli allevamenti nei quali una presenza significativa di infezioni dell'apparato urinario sia messa in evidenza con costanza e ripetitività.

PRIME CONCLUSIONI

Una strategia di attenzione al mangime delle scrofe si può manifestare attraverso due azioni, suddivise per fase produttiva e correlate alla situazione sanitaria dell'allevamento:

· In gestazione, è possibile pensare ad un mangime con tenori di fibra grezza circa doppi rispetto a quelli cui si ricorre normalmente, fornito in quantità superiori circa del 10% rispetto al piano di razionamento tradizionale. Questo favorirà l'assunzione alimentare in sala parto, e di conseguenza le prestazioni di crescita della nidiata. Il costo annuale (ed il relativo calcolo del pay back) di questa tecnica può essere stimato in € 4/scrofa/ anno.

· In lattazione, con un semplice artificio di formulazione è possibile abbattere il pH urinario di oltre 1 punto, portandolo sotto la soglia del valore 6, che può essere considerata una valida barriera alla infezione ascendente da *Escherichia coli.* Questa tecnica trova indicazione nei numerosi allevamenti nei quali l'incidenza delle infezioni urinarie sia elevata, concentrandosi i fattori di rischio soprattutto nella fase di lattazione.

CONFRONTO TRA LE RACCOMANDAZIONI ALIMENTARI DELLE SOCIETA' DI GENETICA SUINA

La diffusione negli allevamenti dell'uso di ibridi commerciali impone ovviamente, in tema di alimentazione dei riproduttori, di considerare attentamente i consigli nutrizionali contenuti nei manuali di conduzione forniti a corredo degli animali da parte dei servizi tecnici delle diverse Società.

Essi rappresentano una sorta di linea guida seguendo la quale gli allevatori clienti dovrebbero ottenere i migliori risultati nel pieno sfruttamento delle potenzialità genetiche degli animali acquistati: è di tutta evidenza che è comune interesse da una parte per le Case di genetica ottenerne l'applicazione presso le Aziende clienti per conseguirne la miglior soddisfazione e fidelizzazione e dall'altra per il cliente per valorizzare al meglio l'investimento effettuato in genetica, quasi mai irrilevante.

Per questo si è chiesto ad alcune tra le principali Società attive in Italia nel settore specifico di inviare l'ultima versione delle norme nutrizionali, e si è provveduto a confrontarne i contenuti, sulla base di parametri ragionevolmente confrontabili.

Non è stato del tutto agevole, perché alcune Società ad esempio esprimono le caratteristiche dei mangimi in valori digeribili per MJ di energia metabolizzabile (ME), altri in valori grezzi espressi in percentuale sulla massa del mangime con l'energia in digeribile (DE) definita in Kcal per kg, altri ancora con diversi riferimenti.

Per questo nel lavoro di organizzazione tabellare delle indicazioni fornite in alcuni casi si è effettuato un processo di conversione dei dati in unità tra loro confrontabili e facilmente comprensibili per il formulista italiano, utilizzando categorie tecniche di comune patrimonio.

Tabella 5. *Raccomandazioni delle Società per la fase di gestazione (riportati i valori medi se espressi in forchetta)*

Anas
DanBred (*)
Goland
Hypor
PIC
Topigs (*)
Fase , giorni
0-21
22-70
71-111
111-114
0-21
22-84
85-111
111-114
0-35
36 -110
111-114
0-14
14-100
100-111
111-114
0-35
36-90
90-111
111 -114
0-42
42-84
85-111
111-114
DE Kcal/kg
3050
3000
3100
3080
3170
3260
Proteina %
14.5
9 (min)

13.5
14
14.5
n.a.
Lisina tot %
0.65
0.36
0.6
0.75
0.68
0.58
M+C tot %
0.5
0.36
0.43
n.a.
(0,21 Met)
0.48
n.a.
Treonina tot %
0.5
0.33
0.47
0.55
0.52
n.a.
Triptofano tot %
0.1
0.11
0.13
0.15
0.2
n.a.
Ca %
1
0.7
0.8
0.95
0.9
0.8
P tot %
0.6

0.4
0.6
0.72
0.75
0.7
Biotina mg/kg
0.65
0.2
0.35
0.2
0.22
n.a.
Vit. E mg/kg
100
36
100
41
66
n.a.

(*) Dati calcolati con le seguenti equivalenze:
1 MJ = 238 Kcal, DE = NE : 0,71, DE = ME : 0,96, Ptot = Put :0,55, Aminoacidi tot = Aminoacidi dig : 0,9

Emerge una certa disparità nelle "fasi" di nutrizione in corso di gestazione.
La prima fase, destinata alla ricostituzione di una ottimale condizione corporea attraverso una fornitura individualizzata del mangime, varia dai 14 ai 40 giorni, la fase centrale di "mantenimento" varia tra i 42 e gli 86 giorni, la terza fase di leggero incremento degli apporti per supportare la crescita fetale ha una durata tra i 40 e gli 11 giorni, mentre tutte le Società raccomandano una riduzione del mangime nei tre giorni antecedenti la data prevista del parto.
Il valore energetico raccomandato è abbastanza in linea con quanto si osserva nella pratica, con due eccezioni (quasi 3200 Kcal di DE raccomandati da PIC, e ancor di più da Topigs), mentre i valori di proteina grezza e di aminoacidi sono globalmente abbastanza inferiori alla prassi corrente (per una minore raccomandazione di circa il 10% rispetto ai già citati 15,5% di proteina con 0,7% di lisina).
Danbred stupisce per la modestia delle raccomandazioni in merito alla proteina ed agli aminoacidi. Pur considerando la difficoltà nell'interpretare le istruzioni (vengono forniti dei valori con parametri di valutazione e di calcolo un po' inusuali), è certo che su questo versante le loro indicazioni sono notevolmente diverse dalle altre.
Per i minerali il profilo è lo stesso delle proteine, con la sola Danbred che consiglia tenori particolarmente bassi: dall'esame complessivo risulterebbe che questa Società sia già tendenzialmente in linea con le citate raccomandazioni di un mangime "fibroso", a bassa energia e bassa concentrazione nutritiva, da consumarsi in quantità proporzionalmente maggiori.

Tabella 6. *Raccomandazioni delle Società per la fase di lattazione (riportati i valori medi se espressi in forchetta)*

Anas
DanBred (*)
Goland
Hypor
PIC
Topigs (*)
Fase , giorni
0-2
3-21
21-28
0-7
8-14
15-28
0-21
22-28
0-8
9-28
0-4
5-14
14-28
0-5
6-28
DE Kcal/kg
3250
3300
3250
3350
3250
3300
Proteina %
17
11.7 (min)
16
16.8
17
n.a.
Lisina tot %
0.96

0.7
0.92
0.9
0.97
0.95
M+C tot %
0.53
0.43
0.52
n.a.
(0,25 Met)
0.49
n.a.
Treonina tot %
0.6
0.46
0.61
0.65
0.62
n.a.
Triptofano tot %
0.2
0.15
0.18
0.2
0.18
n.a.
Ca %
0.9
0.85
0.9
1
0.9
0.81
P tot %
0.55
0.55
0.64
0.8
0.75
0.69

Biotina mg/kg
0.65
0.21
0.35
0.2
0.22
n.a.
Vit. E mg/kg
70
160
100
41
66
n.a.

(*) Dati calcolati con le seguenti equivalenze:
1 MJ = 238 Kcal, DE = NE : 0,71, DE = ME : 0,96, Ptot = Put :0,55, Aminoacidi tot = Aminoacidi dig : 0,9

Anche in questo capitolo emerge una certa disparità nelle "fasi" di nutrizione in corso di lattazione.
La prima fase, destinata al raggiungimento di un buon consumo giornaliero, varia dai 2 agli 8 giorni, la fase centrale di raggiungimento del plateau varia tra i 21 ed i 6 giorni, la terza fase di consumo stabilizzato sui massimi raggiunti ha una durata tra i 7 ed i 14 giorni. Alcune Società consigliano un minor numero di fasi, ma l'obiettivo è chiaramente lo stesso: raggiungere in modo non traumatico, ma più rapido possibile, un elevato consumo di mangime.
Il valore energetico raccomandato è abbastanza in linea con quanto si osserva nella pratica, intorno alle 3250/3300 Kcal di DE, così come avviene per i valori di proteina grezza e di aminoacidi.
Ancora Danbred stupisce per la modestia delle raccomandazioni in merito alla proteina ed agli aminoacidi. Pur considerando la citata difficoltà nell'interpretare le istruzioni, anche qui è certo che su questo versante le loro indicazioni sono notevolmente diverse dalle altre.
Per i minerali il profilo è abbastanza omogeneo tra le diverse fonti.
Dunque un confronto con la Società fornitrice della genetica sui piani alimentari utilizzati appare, alla luce della presente comparazione, certamente utile, soprattutto se dovessero emergere delle importanti differenze tra quanto eseguito in allevamento e quanto indicato nelle loro guide nutrizionali.
Diverso è il caso, certo non infrequente, di uso di genetiche "miste", con incroci tra diversi genotipi anche appartenenti a Società commerciali, sulla base di personali esperienze dell'allevatore.
In questo caso l'unico riferimento devono essere i risultati di allevamento, stante l'impossibilità di riferirsi ad un retroterra genetico noto, chiaro e definito.

CONCLUSIONE

I temi che appaiono più intriganti, ad oggi, nella investigazione e nella ricerca sui mangimi per riproduttori suini riguardano la gestione e l'uso strategico della fibra grezza in corso di

gestazione, e la ricerca di un pH acido nelle urine in corso di lattazione senza impatti negativi sulla palatabilità del mangime.
Un confronto – per quanto effettuato per sommi capi – tra le raccomandazioni alimentari di alcune tra le più diffuse Società di genetica suina, evidenzia, accanto ad una sostanziale omogeneità delle istruzioni, alcune peculiarità connesse ad ogni genotipo, delle quali è opportuno, per l'allevamento cliente di genetica, tenere debito e buon conto.

BIBLIOGRAFIA

Peltoniemi OA, Tast A, Heinonen M, Oravainen J, Munsterhjelm C, Hälli O, Oliviero C, Hämeenoja P, Virolainen JV. Fertility of sows fed ad libitum with a high fibre diet during pregnancy. Reprod Domest Anim. 2010 Dec;45(6):1008-14

Guillemet R, Guérin C, Richard F, Dourmad JY, Meunier-Salaün MC. **Feed transition between gestation and lactation is exhibited earlier in sows fed a high-fiber diet during gestation.** J Anim Sci. **2010 Aug;88(8):2637-47**

Oliviero C, Kokkonen T, Heinonen M, Sankari S, Peltoniemi O. Feeding sows with high fibre diet around farrowing and early lactation: impact on intestinal activity, energy balance related parameters and litter performance. Res Vet Sci. 2009 Apr;86(2):314-9

Veum TL, Crenshaw JD, Crenshaw TD, Cromwell GL, Easter RA, Ewan RC, Nelssen JL, Miller ER, Pettigrew JE, Ellersieck MR. The addition of ground wheat straw as a fiber source in the gestation diet of sows and the effect on sow and litter performance for three successive parities. J Anim Sci. 2009 Mar;87(3):1003-12

Quesnel H, Meunier-Salaün MC, Hamard A, Guillemet R, Etienne M, Farmer C, Dourmad JY, Père MC. **Dietary fiber for pregnant sows: influence on sow physiology and performance during lactation.** J Anim Sci. **2009 Feb;87(2):532-43**

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. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. 2011: 87-93

Grattarola C., Bellino C., Botta E., Dondo A., Maggi E., Massa M., Mondino S., Tursi M., Varnava D., Cagnasso A. Indagine di campo sulla diffusione della cistite della scrofa . Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. 2010: 183-197

Gusmara C., Invernizzi F., Andreoni S., Teli L., Mazzotti A., Sala V. Osservazioni diagnostiche sulle infezioni urinarie (UTI) della scrofa. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. 2010: 198-204

Piumatti M., Strola M., Baricco G., Obertino V. Effetto sul pH urinario delle scrofe di differenti fonti di calcio alimentare e di un pool di acidi organici. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini. 2007: 165-171

Simoni B., Risso S. Acidificazione per via dietetica delle urine di scrofe in lattazione: effetto sui principali parametri di performance. Dissertazione di tesi di specializzazione in patologia suina, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino.2010.

L'ALIMENTAZIONE DEL SUINO DA INGRASSO: NOVITÀ E TENDENZE?

CERATI CARLO

E' datato 14 luglio 1992 il regolamento che oltre che tutelare il marchio del Prosciutto di Parma, disciplina l'alimentazione del suino pesante, exprimentibus della suinicoltura italiana. Tale disciplinare regola e condiziona le scelte del suinicoltore a tal punto da rappresentare la condicio sine qua non delle decisioni economiche e politiche dell'imprenditore agricolo. Non è possibile quindi prescindere da tale protocollo nelle scelte oltre che alimentari anche manageriali.

Il Regolamento si compone di indicazioni molto specifiche riguardo alle materie prime che possono essere impiegate per la produzione dei mangimi destinati ai suini in fase di ingrasso, con l'intento di produrre una coscia fresca consona alle caratteristiche tradizionali del Prosciutto DOP. A tal fine, ingredienti impiegati fino al raggiungimento del peso vivo di 80 kg, possono essere vietati oppure modificati in percentuale o caratteristiche, nella fase successiva di accrescimento che prelude alla macellazione del suino.

Purtroppo, a mio parere, tale rigore non viene osservato nella scelta dei suini riproduttori consentiti, che, non sempre, permettono la produzione di un prosciutto tradizionale. "Dolce come una fetta di Prosciutto di Parma" decantava una pubblicità.

Caratteristiche essenziali per il Prosciutto di Parma sono quantità e qualità del grasso sia di copertura che intramuscolare: bianco e sodo per permetterne il taglio, ingloba le centinaia di componenti volatili e lipofile che caratterizzano l'aroma sui generis del re dei salumi.

La lungimiranza del Disciplinare non specifica quale olio o grasso deve essere impiegato nell'alimentazione del suino, ma ne detta le caratteristiche: "lipidi con punto di fusione superiore a 36° C " fino a 80 kg di pv e "lipidi con punto di fusione superiore a 40° C" nella fase successiva che termina con la macellazione del suino. Tali disposizioni sono essenziali per la futura composizione del grasso del prosciutto che avvolgerà la porzione magra proteggendola, ammorbidendola e preservandone sapori ed aromi, oltre che regolare la corretta penetrazione del sale. Infatti le caratteristiche di consistenza del grasso e la sua resistenza all'ossidazione dipendono dalla sua composizione in acidi grassi, i quali presentano un punto di fusione diverso sia in base al numero di atomi di carbonio che li compongono, sia a seconda del numero di doppi legami che presentano. (tab. 1)

Bisogna ricordare che sono assorbiti a livello intestinale dal suino, preferibilmente, gli acidi grassi a corta o media catena nonché gli insaturi e che, per la produzione di energia, l'animale impiega soprattutto gli acidi grassi saturi con la conseguente tesaurizzazione a riserva corporea degli acidi grassi insaturi. L'acido linoleico, quindi, a lunga catena ed insaturo viene prontamente depositato a livello sottocutaneo. Considerando il suo basso punto di fusione (-5 C°), se la sua percentuale aumenta nel tessuto adiposo, quest'ultimo risulterà molle o comunque meno consistente, meno conservabile perciò più sensibile alle ossidazioni, e tecnologicamente scorretto.

Quando il Disciplinare del Prosciutto di Parma è stato redatto, effettivamente il punto di fusione dello strutto era superiore a 40° , ma con avvento delle genetiche nord europee, caratterizzate da indici di conversione più favorevoli a seguito di produzione di carne più magra, questo valore si è ridotto.

In questi anni siamo stati attori e spettatori di una trasformazione del contenuto in grassi della carne suina che ora presenta una ridotta percentuale di colesterolo (-33%) ed in acidi grassi aterogeni con contemporaneo aumento della quota di acidi grassi insaturi (ac oleico

+63%; ac linoleico +234%) che possiedono un'azione protettiva sul circolo arterioso ma che tecnologicamente riducono la conservabilità dei prodotti carnei a causa di una maggior predisposizione all'ossidazione.
A seguire è rilevante l'apporto bromatologico nel mangime completo della componente maidica: "mais fino al 55% della sostanza secca della razione". Al contempo è sconcertante rilevare quali differenze possono riscontrarsi a seguito dell'impiego di svariate cultivar di mais coltivate in terreni a diversa composizione ed in condizioni ambientali variabili. (Fig. 1 – Fig. 2) E' ovvio che tale problematica viene ulteriormente ampliata dall'utilizzo di altri ingredienti (cereali e non) che presentano mutevolezza nella loro composizione analitica. Pertanto anche il più sofisticato data base non permetterà al nutrizionista di azzeccare la reale analisi del mangime elaborato.
Negli ultimi anni è stato immesso sul mercato il glicerolo, disponibile in grandi quantità a seguito della produzione del biodiesel a partire da oli vegetali, che mostra interesse quale alimento energetico ma non ancora entrato a far parte della lista degli alimenti consentiti dal Disciplinare del Prosciutto di Parma. Si ricorda che tale lista non è mai stata revisionata in 20 anni. Elemento chiave per la sintesi dei trigliceridi a livello di tessuto adiposo è il glicerolo 3 fosfato prodotto dall'adipocita a partire dal glucosio. Per assicurare un adeguato ingrassamento del suino occorre, contemporaneamente ai lipidi, fornire i precursori del glucosio ematico. Sull'impiego di questo prodotto sono stati effettuati diversi studi che dimostrano come la sostituzione del 5% di cereali con glicerolo non determina modificazioni quali-quantitative in animali e prodotti carnei derivati risultando, nel contempo, una razione più economica (Della Casa).
Il miglioramento della digeribilità, e quindi delle performance del suino, può essere ottenuto sia impiegando materie prime caratterizzare intrinsecamente da maggior digeribilità, sia utilizzando enzimi esogeni di sintesi, sia rendendo ottimale il rapporto tra contenuto proteico ed aminoacidi essenziali in forma libera (proteina ideale) oltre che agendo sulle dimensioni del particolato alimentare.
Riducendo la granulometria del mangime si ottiene una maggior esposizione degli alimenti all'azione degli enzimi digestivi endogeni e quindi un aumento del coefficiente di utilizzazione dell'energie e dell'azoto con conseguente miglioramento dell'ICA riducendosi contemporaneamente l'escrezione della sostanza secca (fino a – 22%) e dell'azoto (fino a -25%).
E' importante rilevare che mangimi a stessa granulometria media ma caratterizzati da una uniformità di particolato diversa, non permettono di ottenere gli stessi risultati produttivi. Un basso valore di SGW (single grain weigth), sinonimo di buona uniformità del particolato, associato ad una idonea granulometria favorisce elevate rese alimentari.
Ciò non deve indurre il produttore di mangimi a ridurre a livelli estremi il diametro del particolato del mangime, in quanto si determinerebbe un aumento delle sindromi ulcerative nella pars oesophagea dello stomaco, un aumento dei fenomeni di cannibalismo e, a seguito di una aumentata polverosità dell'ambiente, una maggior predisposizione a contrarre malattie broncopolmonari. (Tab. 2 e Fig. 3-4-5)
La dir IPPC obbliga gli allevatori ad adottare le "migliori tecniche disponibili al fine di ridurre l'impatto ambientale". La Dir CEE 91/676 norma l'attività di utilizzo agronomico degli effluenti di allevamento. Che fare per ridurre la quantità di azoto da riversare sui terreni? Un aiuto può essere fornito dalla somministrazione di mangimi completi formulati senza eccedenze proteiche con un rapporto ottimale tra contenuto proteico ed aminoacidi essenziali limitanti in forma libera. Diverse sperimentazioni sono state condotte anche in Italia, specie dal gruppo del Dr Della Casa, che dimostrano come riducendo il tasso proteico

nell'alimento, pur mantenendo invariate le aliquote di aminoacidi liberi, si ottengano performance di allevamento e di macellazione sovrapponibili, eccezion fatta per l'indice di incremento giornaliero. Per quanto concerne il prosciutto, nel caso di diete ipoproteiche ma isoenergetiche, aumentando la disponibilità di energia per la sintesi lipidica, si può rilevare una aumentata adiposità accompagnata da riduzione della percentuale di acido linoleico ed un ridotto calo di raffreddamento in confronto a diete standard. Contemporaneamente si rileva, riducendo l'azoto somministrato, che diminuisce l'ammoniaca emessa in atmosfera e la quantità di azoto presente nei liquami. Oltre a ciò si riduce il volume dei liquami in quanto si abbassa il consumo idrico dell'animale a seguito di un ridotto consumo di acqua per minor fabbisogno necessario per l'escrezione urinaria di azoto.
Huges ('76) ha definito il benessere animale "come uno stato di completa salute mentale e fisica nel quale esso si trova in armonia con l'ambiente che lo circonda". Tale obiettivo viene perseguito anche attraverso una alimentazione adeguata, tanto è vero che una delle 5 libertà espresse dal Farm Animal Welfare Codes ricorda che la dieta deve essere sufficiente, per quantità e qualità, a garantire salute e vigore. Allora perché non spingerci oltre e soddisfare anche l'aspetto edonistico somministrando un mangime che tenga conto anche delle preferenze alimentari dei suini stimolando l'ingestione e predisporre l'animale ad ottenere il massimo incremento ponderale che la sua potenzialità genetica permetta.
I suini sono molto sensibili ai sapori in virtù di un elevato numero di papille gustative (15.000 vs le 900 dell'uomo) e sono in grado di distinguere tutti e 5 i sapori riconosciuti (acido, amaro, salato, dolce ed umami).
L'utilizzo di acidificanti in alimentazione suina risale agli anni 50. In post svezzamento ed all'ingrasso l'impiego di acidi organici o loro sali nella razione:

- migliora le performance produttive
- effetto antitampone a livello gastrico
- impatto positivo sulla flora intestinale patogena e non
- promuovono l'assorbimento e la ritenzione di azoto
- migliorano la digeribilità dei grassi

I suini sono in grado di distinguere gli alimenti che contengono acidi organici ed anche le caratteristiche di ognuno. Infatti non accettano in modo equivalente razioni supplementate con acidi organici diversi o con loro differenti percentuali. L'accettabilità della razione acidificata quindi varia a seconda della sostanza impiegata ed, a volte, è difficile stabilire se l'aumento di consumo dell'alimento sia correlato al miglioramento del gusto della dieta oppure sia la conseguenza degli effetti positivi sulla salute e sulle funzioni digestive dell'animale.
I composti amari non sono apprezzati dal suino che manifesta un atteggiamento di netto rifiuto con deviazione e scuotimento della testa. Questa avversione porta a difficoltà nella gestione di alcuni farmaci (tilmicosina, eritromicina) e mangimi semplici (farina di estrazione di colza, farina di erba medica disidratata).
Mentre carenze di sodio o di cloro potrebbero limitare le performance dell'animale, si rileva che i suini possono tollerare elevate concentrazioni di cloruro di sodio nella dieta a condizione che possano disporre di acqua a volontà. In caso contrario si corre il rischio di avvelenamento. Recentemente si è rivolto l'interesse a elevate concentrazioni di cloruro di sodio nelle diete al fine di limitare l'incidenza dei fenomeni di cannibalismo. Nel suino, come nell'uomo, la sensibilità al sapore salato sembra essere dipendente dall'età. Ciò pare essere legato alla maturazione tardiva di meccanismi centrali e/o periferici di percezione di tale sapore. I suinetti inferiori a 4 mesi sono poco sensibili al gusto salato mentre scrofe e suini da ingrasso sono stimolati all'ingestione di alimento da dosi crescenti di cloruro di sodio.

Il suino mostra predilezione verso le sostanze zuccherine, dal sapore dolce, in particolar modo per il saccarosio. Questa attrazione viene manifestata con atteggiamenti particolari:

- testa rivolta verso lo stimolo
- successione di movimenti di suzione e deglutizione
- elevata velocità di ingestione
- maggior quantità di alimento assunto
- aumentato fabbisogno idrico (anche superiore di 5 – 6 volte)

La percezione varia da zucchero a zucchero ed i limiti di rilevazione sono molto diversi. Il valore dolcificante percepito dal suino è molto diverso da quello dell'uomo ed uno zucchero gradito a quest'ultimo può non esserlo per il primo. Ad esempio nel suino se poniamo il potere edulcorante del saccarosio uguale a 1, il destrosio è uguale a 0,125 mentre nell'uomo può essere valutato esattamente il doppio (0.250). in alimentazione umana spesso gli zuccheri sono sostituiti da edulcoranti artificiali ad elevata intensità. Solo saccarina e neoesperidina figurano tra le sostanze aromatiche ed aperitive permesse nei mangimi (GU 2002/C329 CEE). Il loro impiego è permesso fino all'età di 4 mesi. Tuttavia se nell'uomo la saccarina ha un potere dolcificante superiore di 215 volte quello del saccarosio, nel suino esso è superato solo di 3 volte. Esiste inoltre una notevole differenza individuale di percezione dovuta alla presenza/assenza di siti di riconoscimento o di interazione con le molecole di saccarina. La neoesperidina, percepita dall'uomo 3.600 volte come più dolce del saccarosio, sembra lasciare indifferenti i suini per assenza di recettori specifici. Può comunque essere impiegata per i suoi effetti di potenziamento dei sapori e per la capacità di sopprimere il retrogusto sgradevole della saccarina determinando una sensazione dolce di lunga durata.

Il sapore umami designa una nota comune ad alcuni alimenti quali l'asparago, il pomodoro, il dado, la pasta di acciughe, il Parmigiano reggiano e il Prosciutto di Parma. 3 sono le molecole di riferimento:

- glutammato monosodico
- IMP (inisina monofosfato)
- GMP (guanosinamonofosfato)

E' percepito chiaramente ed apprezzato dal suino, infatti l'impiego di glutammato monosodico nel mangime permette una maggior ingestione di alimento associata a maggior velocità di crescita.

In conclusione diversi sono i fattori che incidono sulle caratteristiche alimentari e che possono interferire con la qualità della carne di suino e conseguentemente sulle specifiche del prosciutto, ma non bisogna mai dimenticare che le buone performance si ottengono solo allevando animali sani, esenti da malattie anche non clinicamente manifeste, che possono minare significativamente i risultati aziendali. (Tab.3)

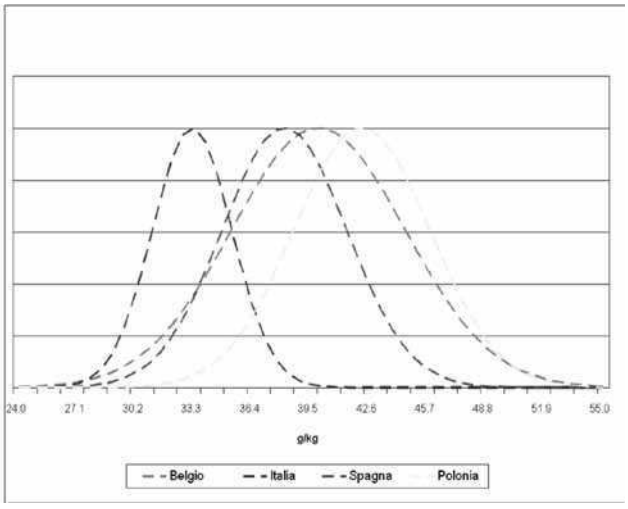
Tab 3

APP	25-100 g
Rinite	25-100 g
PRRS	50-200 g
Mycoplasma	25-150 g
Rogna	35-60 g
Streptococco	0 g
Dissenteria	30-35 g

Tab.1

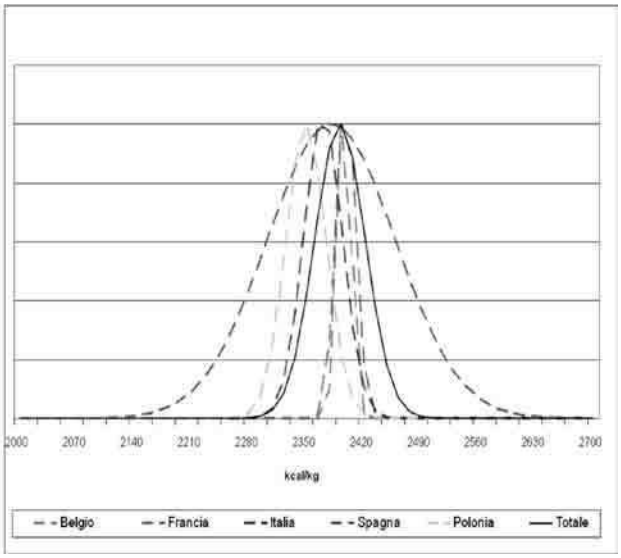
Punto di fusione degli acidi grassi	
In base al numero di atomi di carbonio	
Ac. Butirrico (C4)	-8 C°
Ac Caproico (C6)	-3 C°
Ac Caprilico (C8)	16 C°
Ac Caprinico (C10)	31 C°
Ac Laurico (C12)	43,2 C°
Ac Miristico (C14)	53,9 C°
Ac Palmitico (C16)	62,8 C°
Ac Stearico (C18)	69.6 C°
Ac Arachico (C20)	75,4 C°
In base al numero di doppi legami	
Ac Stearico (C18:0)	69,6 C°
Ac Oleico (C18:1)	16 C°
Ac Linoleico (C18:2)	-5 C°
Ac Linolenico (C18:3)	-11 C°

Fig 1



Mais: grasso greggio

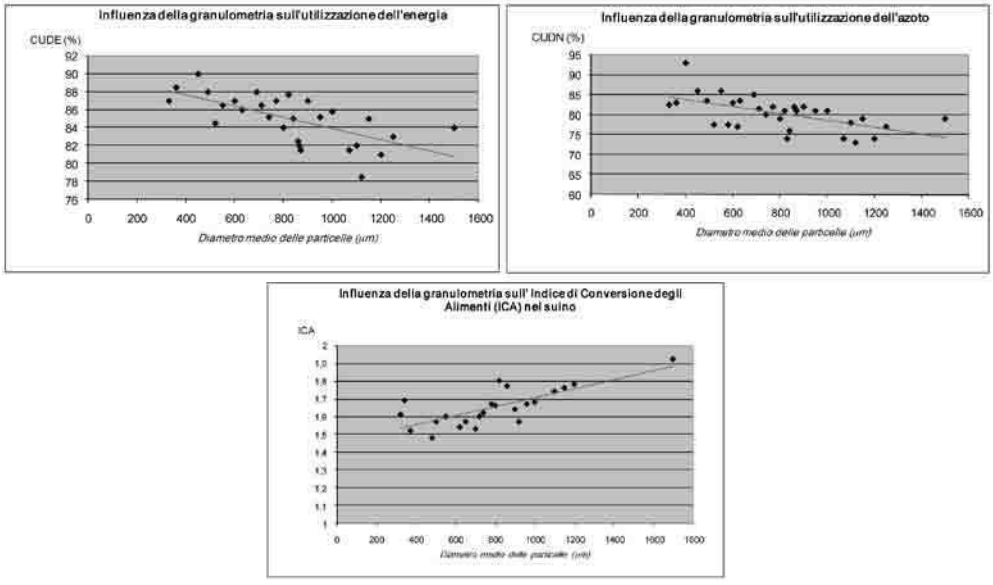
Fig 2



Tab 2: target granulometrici

Scrofe	***800 µm***
Suinetti	***500 µm***
Ingrasso	***700 µm***

Fig 3 – 4 - 5



ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

SU ALCUNI PROBLEMI "VECCHI", ANCORA "NUOVI"

Salsomaggiore Terme, 30 Settembre 2011

TECNICHE E STRUMENTI PER LA VALUTAZIONE DELLA CARCASSA SUINA

VINCENZO RUSSO

Ordinario di Zootecnica speciale nell'Università di Bologna

La valutazione delle carcasse ha per obiettivo la determinazione di alcune loro caratteristiche importanti ai fini di una classificazione commerciale. La classificazione consiste nell'attribuzione delle carcasse a classi commerciali diverse in base alla valutazione ottenuta. Le due operazioni, spesso indicate col solo termine di classificazione, servono per determinare su basi oggettive la qualità e il valore economico delle singole carcasse. Di conseguenza esse rappresentano uno strumento essenziale per rendere più efficiente il mercato perché forniscono una base certa e trasparente per il pagamento dei suini in base alla qualità nelle transazioni tra allevatori e macellatori e perché consentono di rilevare in modo uniforme le quotazioni dei suini sui mercati interni e internazionali. L'utilità della classificazione delle carcasse non si limita solo a livello commerciale, ma si manifesta anche a livello produttivo .Gli allevatori, infatti, attraverso questo strumento, oltre a ricevere un pagamento equo e congruo con la qualità degli animali prodotti, vengono a conoscenza delle caratteristiche delle carcasse prodotte e possono cercare di adeguarle sempre di più a quelle richieste dal mercato per ottenere il prezzo più elevato, curando meglio la scelta del tipo genetico, l'alimentazione, le tecniche d'allevamento ecc.
Le caratteristiche che determinano la qualità della carcassa sono tante e diverse tra vari stati e spesso tra le regioni di uno stesso stato. Per questo l'argomento verrà trattato con riferimento alla classificazione europea, che a distanza di 45 anni dall'adozione è stata resa obbligatoria anche in Italia(tabella 1)

Tabella 1 - Le tappe della classificazione delle carcasse nella UE e in Italia

1967	Prima tabella di classificazione: criteri soggettivi ed oggettivi.
1970	Modificazione tabella; raccomandazione che venga applicata in tutti i Paesi.
1974	Regolamento per la coesistenza delle tabelle CEE 1970 con sistemi basati sulla stima PMC in uso in UK, DK, IRL.
1984	Tabella EUROP: abbandono criteri soggettivi e adozione PCM come unico criterio di valutazione.
1988	Autorizzazione primi metodi di classificazione per l'Italia: FOM, DESTRON, OP.
2001	Per l'Italia sostituzione equazioni 1988 con nuove equazioni e nuovi strumenti.
2007	Obbligo uso della tabella EUROP in tutti i Paesi
2011	Resa esecutiva la obbligatorietà della classificazione in Italia

La classificazione europea delle carcasse suine è stata istituita nel 1967. Inizialmente la valutazione veniva effettuata con una combinazione di criteri oggettivi e soggettivi. Nel 1984 i criteri soggettivi sono stati abbandonati e si è passato all'attuale sistema basato esclusivamente sulla percentuale di carne magra (PCM), stimata oggettivamente mediante misure strumentali dello spessore del lardo dorsale o di altre parti della carcassa. In Italia, dove tuttora la commercializzazione dei suini avviene per tradizione in base al peso vivo, non è stata mai applicata né la vecchia né la nuova classificazione, con l'eccezione di alcuni macelli cooperativi che effettuano il pagamento dei suini a peso morto. Tuttavia l'Italia, dopo aver creato, con la definizione delle equazioni nazionali di stima della percentuale di carne magra, fin dal 1988 le premesse per l'applicazione, a partire da quest'anno ha reso operativa la classificazione europea, per ottemperare ai regolamenti europei
La richiesta dei consumatori e di tutti componenti della filiera che operano a valle degli allevatori è orientata verso carne e prodotti carnei ricchi di tessuto muscolare e poveri di grasso e che abbiano ottime caratteristiche, nutritive, organolettiche e tecnologiche (tabella 2).

Tabella 2 - Caratteristiche qualitative della carne suina

A - NUTRIZIONALI
- contenuto proteico
- contenuto di vitamine
- contenuti di minerali
- valore calorico
B - ORGANOLETTICHE
osservabili all'atto dell'acquisto
- colore
- grana e tessitura
- perdita di essudato dalle superfici di taglio
- marezzatura
osservabili all'atto del pasto
- tenerezza
- succulenza
- sapidità
- assenza di odori estranei
C - TECNOLOGICHE
- contenuto in acqua
- capacità di ritenzione idrica
- pH
- capacità di assorbimento sale
- contenuto in acidi grassi insaturi
- n. di iodio nel grasso

La valutazione ideale della carcassa dovrebbe prendere in considerazione il contenuto di carne magra e tutte queste caratteristiche qualitative Tuttavia mentre il contenuto di carne magra è ritenuto una caratteristica importante in tutti i Paesi europei ed è rilevabile in modo oggettivo, preciso, ripetibile, rapido ed economico lungo la catena di macellazione, le caratteristiche

qualitative della carne assumono importanza diversa nei vari Paesi e nei diversi operatori della filiera suinicola (tabella 3), ma soprattutto non possono essere rilevate nel modo suddetto perche al momento attuale non esistono tecnologie adeguate. Perciò oggi l'unico parametro universalmente accettato per la valutazione delle carcassa è il contenuto di carne magra , che a sua volta è altamente e positivamente correlato con la quantità di tagli pregiati. Il contenuto di carne magra è espresso come percentuale di carne magra sulla carcassa.

Tabella 3 - Caratteristiche qualitative della carne suina considerate dai vari operatori della filiera suinicola e dai consumatori.

MACELLATORE	INDUSTRIALE TRASFORMATORE	CONSUMATORE
Calo di raffreddamento	Calo di cottura	Aspetto attraente del muscolo
Calo di sgocciolamento	Calo di stagionatura	Quantità di grasso inter- e intramuscolare
Aspetto attraente del muscolo	Attitudine alla trasformazione nei vai prodotti di salumeria	Tenerezza
Consistenza, colore e odore del grasso	Aspetto attraente del muscolo	Succulenza
	Consistenza, colore e odore del grasso	Sapidità
		Calo di cottura

Stima della percentuale di carne magra della carcassa (PCM).
I pilastri della valutazione delle carcasse in base alla percentuale di carne magra sono riportati nella tabella 4:

Tabella 4 - Pilastri della valutazione della carcassa in base alla PCM

- definizione carcassa standard
- definizione rilevamento peso carcassa
  - a caldo o a freddo
  - determinazione cali
- definizione della carne magra
- definizione metodologia per calcolo indiretto PCM
  - numero di suini
  - misure oggettive e strumenti
  - equazione di previsione PCM
  - errore statistico tollerabile

La stima diretta del contenuto di carne magra richiederebbe la dissezione e l'analisi chimica dell'intera carcassa o di una sola mezzena e, perciò, non è attuabile nella valutazione commerciale. Di conseguenza occorre utilizzare metodi di stima indiretta basati sula misura di caratteristiche della carcassa correlati con il contenuto di carne magra e facilmente rilevabili sulla catena di macellazione in modo rapido, accurato e poco costoso. Le caratteristiche che

soddisfano questi requisiti sono lo spessore del lardo dorsale , lo spessore e la superficie di qualche mescolo e i loro rapporti. Tra queste lo spessore del lardo dorsale è quello che presenta in sommo grado tutti i requisiti richiesti. La sua rilevazione può essere effettuato con strumenti manuali e automatici lungo la linea di separazione delle mezzene o lateralmente a questa perché si è visto che tutte le misure sono fortemente correlate in modo negativo con la percentuale di carne magra e positivamente con quello di grasso, come mostrano i coefficienti di correlazione semplici riportati nella tabella 5.

Tabella 5 - Intervallo dei coefficienti di correlazione tra misure effettuate sulla carcassa e PCM

Spessore lardo dorsale	
Centrale lombi [a]	- 0,60 - 0,85
Ultima costola [a]	- 0,60 - 0,80
3/4 U L 8 cm [b]	- 0,65 - 0,85
3/4 U C 8 cm [c]	- 0,70 - 0,85
U C 6 cm [d]	- 0,70 - 0,80
Spessore muscolo LD	
3/4 U C 8 cm [c]	0,25 - 0,50

[a] sulla linea mediana della mezzena;
[b] a 8 cm tra terza e quartultima vertebra lombare;
[c] a 8 cm tra terza e quartultima costola;
[d] a 6 cm a livello dell'ultima costola

Le misure effettuate lateralmente sono preferite, non tanto perché presentano in genere coefficienti di correlazione con il contenuto di carne magra appena più elevati, quanto piuttosto perché, essendo prese automaticamente con una sonda, non sono sospettabili di manipolazione da parte dei rilevatori. Ai fini della previsione del contenuti di carne magra possono essere utilizzati una o più misure dello spessore del lardo, ma l'aumento di precisione che si consegue con più misure di norma non paga i maggior costi del rilievo.
Lo spessore del muscolo *longissimus dorsi*, sebbene in misura meno rilevante, risulta correlato positivamente col contenuto di carne magra e in genere viene utilizzato per aumentare la precisione della stima che si ottiene con la sola misura dello spessore del lardo dorsale.

Strumenti di misura

Sono disponibili numerosi strumenti basati su principi fisici diversi per rilevare lungo la catena di macellazione lo spessore del lardo dorsale e del muscolo *longissimus dorsi* o di altre caratteristiche oggettivamente rilevabili sulla carcassa. Si va dal semplice righello a sistemi semiautomatici o automatici fino a sofisticati sistemi derivati da tecnologie molto avanzate sviluppate nel campo biomedico (tabella 6).

Tabella 6 - Categorie di strumenti classificati in base al principio fisico utilizzato per effettuare le misure necessarie per la determinazione della PCM

riflessione: FOM, HGP, CGM, DESTRON, ecc.
ultrasuoni: UFOM, AUTOFOM, ecc.
elettromagnetismo: TOBEC, ecc
Immagine (VIA): VCS2000, CSB-Image-Meater, ecc.
tecnologie biomediche sofisticate: TAC, RMN, ecc

Una prima categoria di apparecchiature, di cui fanno parte ad esempio il Fat-O-Meater (FOM), l'HenessyGrading Probe (HGP), sfrutta la differenza con cui il lardo e il muscolo per effetto del loro diverso colore riflettono una fonte di luce incidente. L'elemento fondamentale di queste strumenti è una sonda a fibra ottica, che penetra nella mezzena da un lato all'altro in punti prefissati. Questi possono variare da Paese a Paese, ma generalmente vengono preferiti quelli tra la terza e quartultima costola e tra la terza e quartultima vertebra lombare a 6 o 8 cm dalla linea di separazione della carcassa in mezzene. Il punto tra la terza e quartultima costola è preferito perché consente con un'unica infissione della sonda la misura simultanea dello spessore del lardo e del sottostante muscolo longissimus dorsi. Le misure rilevate vengono trasmesse automaticamente ad un computer, che tramite un'equazione, elaborata precedentemente per lo scopo, calcola la PCM. Questa tipologia di strumenti semiautomatici, che è stato la prima ad essere sviluppata , funziona in modo soddisfacente nelle disagevoli condizioni dei macelli. Attualmente gli strumenti di questa categoria sono i più utilizzati nei Paesi europei e sono quelli presente nei macelli italiani.
Un'altra classe di strumenti utilizza la diversa velocità con cui gli utrasuoni si trasmettono nei diversi tessuti. Rispetto a quelle a riflessione della luce, queste apparecchiature hanno il vantaggio di essere più veloci e non invasive. I primi strumenti di questo tipo erano manuali, mentre successivamente sono stati sviluppati sistemi semiautomatici (UFOM o Ultrafom) o ompletamente automatici, come l'Autofom. Quest'ultimo sistema è particolarmente interessante perché consente di classificare fino a 1.150 carcasse all'ora. Il sistema si basa sulla scansione ultrasonica del corpo intero del suino macellato prima che venga eviscerato . Per ogni carcassa vengono effettuati 3.200 rilievi, da cui sono ricavate 127 variabili ,che descrivono la composizione della carcassa e sono utilizzate per la stima della PCM.. L'Autofom è stato sottoposto a sperimentazione in Danimarca, Stati Uniti e Germania con risultati paragonabili o miglior di quelli ottenuti col FOM. Il metodo è autorizzato dalla Commissione Europea per l'uso in Danimarca.
Un altro sistema di valutazione della carcassa, si basa sulla scansione elettromagnetica della carcassa. L apparecchiatura denominata TOBEC (total body electrical conductivity) è stata sviluppata e sperimentata negli Stati Uniti. Essa misura la massa corporea magra della carcassa mediante la conduttività elettrica corporea totale. Le carcasse o le mezzene poste su una slitta sono fatte passare a velocità costante attraverso tunnel in cui c'è un campo elettromagnetico di 2,5 MHz. La conduttività viene misurata in 64 intervalli equidistanti a mano a mano che la carcassa attraversa il tunnel. La stima del contenuto di carne magra viene effettuato mediante un'equazione di regressione che combina i valori rilevati con la lunghezza e la temperatura della carcassa. I risultati delle ricerche effettuate mostrano che si ottiene una stima della PCM con precisione soddisfacente.
Un a altro gruppo di apparecchiature utilizza il principio dell'analisi dell'immagine (VIA). Con questa tecnica è possibile valutare in modo oggettivo alcune caratteristiche , che tradizionalmente venivano valutate in modo soggettivo. Questi sistemi si basano sull'acquisizione di immagini della carcassa con l'ausilio di un numero di telecamere variabile tra le diverse apparecchiature. Dalle immagine , il sistema elabora automaticamente centinai di misure ,non solo di spessore ma anche di lunghezza, larghezza, angoli e area del grasso e dei muscoli, che tramite un'equazione di regressione multivariata sono utilizzate per la stima della PCM. La precisione di stima è soddisfacente. Inoltre mediante altre equazioni predisposte allo scopo questa tipologia di strumenti permette di stimare la composizione del prosciutto e degli altri tagli. Questi strumenti hanno il vantaggio di effettuare le misurazioni senza venire a contatto con la carcassa.
Infine occorre menzionale le potenzialità delle tecnologie biomediche, da cui peraltro sono

state mutuate anche quelle ad ultrasuoni e a conduttività elettromagnetica. Tra queste sono state sperimentate per la stima della percentuale di carne magra la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare(RMN). Come ci si attendeva i risultati sono stati eccezionale: la deviazione standard residua della stima della PCM effettuata con queste apparecchiature si riduce di più della metà rispetto al valore osservato per gli altri sistemi. Al momento attuale la loro utilizzazione operativa non è neppure ipotizzabile per gli alti costi di acquisto e di gestione e perché queste apparecchiature, progettate per essere usati ambienti sanitari agevoli, richiederebbero una riprogettazione per adeguarli alle condizioni disagevoli dei macelli. Invece la tomografia computerizzata è stata autorizzata dalla Unione europea come metodo di riferimento per la determinazione del peso totale dei muscoli della carcassa, in sostituzione della dissezione totale, ai fini della definizione delle equazioni di stima della PCM dei vari strumenti.

Definizi0ne delle equazioni di stima della PCM

Tutti gli strumenti devono essere corredati da un'equazione , che attraverso le misure effettuate calcoli la percentuale di carne magra. Per trovare questa equazione è necessario effettuare una prova sperimentale di dissezione delle carcasse, rispettando precisi requisiti metodologici e margini di errori prefissati. Questi possono variare nei diversi mercati mondiali. Qui di seguito vengono illustrate per sommi capi le regole stabilite dalla Commissione europea, che deve autorizzare i metodi nazionali di stima, proposti dai Paesi che ne fanno parte. La percentuale di carne magra deve essere calcolata come rapporto tra quantità di carne magra e peso della carcassa. Questi elementi sono suscettibili di variazioni. Il peso della carcassa differisce a seconda della sua costituzione anatomica, che per tradizione o per motivi tecnici può contenere o no alcune parti del corpo,. e del tempo trascorso tra il suo rilevamento e la macellazione. La rilevazione della quantità di carne magra può variare in funzione del punto a cui viene spinta la dissezione. Per rendere uniformi questi rilevamenti, tutti questi aspetti sono stati definiti con precisione nei regolamenti comunitari (tabella 7).

Tabella 7 - Definizione della carcassa standard e del peso della carne magra

carcassa standard:

Corpo del suino macellato, dissanguato e svuotato, intero o diviso a metà, senza la lingua, le setole, gli unghielli, gli organi genitali, la sugna, i rognoni e il diaframma.

Peso della carcassa

Peso rilevato entro 45 minuti dalla macellazione meno il 2%.

carne magra per classificazione EUROP:

Peso totale dei muscoli rossi striati purché siano separabili con il coltello (dissezione totale).

Peso dei muscoli rossi striati della coscia spalla, lombata con filetto e pancetta (dissezione parziale).

Le prove sperimentali devono essere effettuato su un campione di almeno 120 carcasse rappresentativo della produzione suinicola in cui lo strumento dovrà essere utilizzato. Le equazioni di stima della percentuale di carne magra devono essere elaborate con metodi statistici convalidati e sono autorizzate soltanto se l'errore statistico non supera una determinata soglia. Nel caso della classificazione europea l'errore statistico viene valutato come deviazione standard residua della stima ottenuta con l'equazione e la soglia e stata fissata a meno di 2,5.

In conclusione oggi è possibile valutare oggettivamente e con soddisfacente precisione la qualità, della carcassa, seppure col solo criterio del percentuale di carne magra. A tal fine sono disponibili una molteplicità di strumenti con livelli di complessità, automazione e operatività differenti e a costo più o meno elevato. Tra questi ciascuna impresa di macellazione potrà scegliere quello più idoneo in base alle sue esigenze e ai costi di acquisto e di gestione.

BIBLIOGRAFIA

Berg E**.** P, Forrest J. C., Fisher J. E (1994) Electromagnetic scanning of pork carcasses in an on-line industrial configuration. J. Anim. Sci.. 72:2642.

Brondum J., Egebo M., Agerskov C:, Busk H. (1998) On-line pork grading carcass with Autofom ultrasound system. J.Anim. Sci.,76, 1859.

Busk H., Olsen E.V., Brøndum J. (1999) Determination of lean meat in pig carcasses with the Autofom classification system. . Meat Science, 52, 307.

European Community (2008) Commission regulation (EC) No 1249/2008 laying down detailed rules on the implementation of the Community scales for the classification of beef, pig and sheep carcases and the reporting prices thereof.

Forrest J. C., Kuei C. H., Orcutt M. W., Shinckel A.P., Stouffer J.R., Judge M. D. (1989) A review of potential new methods of on-line pork carcass evaluation. J.Anim. Sci.,67, 2164.

Font i Furnols M., Teran F., Gispert M. (2009) Estimation of lean meat content in pig carcasses using X-ray computed tomography and PLS regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **98 (**1), 31.

Font i Furnols M., Gispert M. (2009) Comparison of different devices for predicting the lean meat percentage of pig carcasses. Meat Science,83,, 443.

Engel B., Lambooij E., Buist W.G., Vereijken P. (2011) Lean meat prediction with HGP, CGM, and CSB- Image-Meater, with prediction accuracy evaluated for different proportions of gilts, boars and castrated boars in the pig populations. Meat Science, 90, 338.

Russo V., Catalano A. (1967) Studio delle correlazioni tra alcune misure lineari e ponderali delle carcasse suine ai fini di una classifica commerciale. Produzione Animale, 6, 191.

Russo V. (1979) Valutazione e classificazione delle carcasse suine. Suinicoltura,20,(4), 23

Russo V. (1984) La qualità della carcassa e della carne quale mezzo per la valorizzazione del suino pesante. Suinicoltura, 25, (4), 23.

Russo V., Lo Fiego D.P., Badiani A., Bigi D., Fabbri R., Bosi P., Barchi D., Benatti L. (1989) Metodi di classificazione delle carcasse suine in Italia. Suinicoltura 30, (4), 109.

Russo V. (1991) Qualità totale della carne suina: valutazione, produzione e valorizzazione. Atti della Società Agraria di Lombardia, anno CXXIX, Bullettino dell'Agricoltura, fascicolo n° 2/91, 5.

Schinckel A. P., Wagner J. R., Forrest J. C., Einstein M. E.(2010)
Evaluation of the prediction of alternative measures of pork carcass composition by three optical probes. J.Anim. Sci.,88, 767.

MANAGEMENT DELL'ALLEVAMENTO IN FUNZIONE DELLA CLASSIFICAZIONE EUROP

ANTONIO CALEFFI

Rossana Mangimi, Revere (MN)- Ufficio Tecnico

Parole chiave: DOP, EUROP, ingrasso
Key words: EUROP carcass classification, fattening

Riassunto: Il lavoro vuole essere un aiuto per affrontare i problemi insorti in seguito all'introduzione della classificazione delle carcasse secondo la normativa europea detta griglia EUROP. Sono affrontati i problemi legati alla nutrizione, alla gestione dei pasti, al benessere, alla sanità e al tipo genetico il tutto visto in funzione del miglioramento delle caratteristiche delle carcasse in fase di macellazione al fine di ottenere il risultato più idoneo per le produzioni DOP italiane.

Summary: This paper aims at approaching the problems connected with the recently introduced carcass classification (EUROP). Nutrition, feed administration, welfare, health status and genetic can contribute to increase the quality of the carcass evaluated by the EUROP classification in order to obtain suitable products for the DOP Italian processed meat.

INTRODUZIONE

Pochi mesi fa e più precisamente dallo 01/07/2011 anche in Italia dopo un lungo ritardo rispetto ai partner europei è stato introdotto il sistema di valutazione delle carcasse suine secondo la normativa europea la cosiddetta griglia EUROP. Tra l'altro questo metodo era già stato previsto anche dai disciplinari di produzione delle più importanti DOP italiane. L'introduzione di questo nuovo metro di valutazione delle carcasse ha determinato una eliminazione dai circuiti tutelati di un elevato numero di cosce con consistenti ripercussioni economiche per gli allevatori in quanto ovviamente i macelli sono stati "obbligati" loro malgrado ad effettuare delle trattenute sulle liquidazioni delle partite valutate con il nuovo metodo, in particolare sono molte le cosce fuori circuito tutelato in quanto attaccate a mezzene classificate troppo magre (classe E). Il presente lavoro si prefigge il compito di indicare il management dell'allevamento al fine di ridurre il rischio di produrre suini con caratteristiche che alla macellazione non saranno ritenute idonee alla produzione tipica tutelata italiana.

NUTRIZIONE

Le scelte alimentari sono con ogni probabilità quelle che maggiormente influenzano le caratteristiche delle carni e soprattutto condizionano le possibili deposizioni di grasso. A questo scopo il disciplinare di produzione del "Prosciutto di Parma" al quale si riferiscono in ogni caso tutte le più importanti produzioni DOP italiane, prevede una serie di prescrizioni in campo alimentare finalizzate a ottenere moderati accrescimenti giornalieri e una quantità e qualità del grasso di copertura idonea alla trasformazione delle cosce in prosciutti. Al fine di ridurre il rischio di produrre animali inidonei alle trasformazioni DOP dovremo quindi cercare di soddisfare i fabbisogni che si riferiscono al tipo genetico allevato o meglio nel caso di animali a elevata capacità di crescita limitarne l'accrescimento muscolare rispetto alla deposizione di grasso. Questo obbiettivo possiamo tra le altre ottenerlo introducendo un'alimentazione multifase caratterizzata dall'utilizzo di tre o più mangimi formulati allo

scopo di influenzare la crescita in massa grassa soprattutto nel periodo di finissaggio. Il rapporto energia/proteina dei mangimi si sposterà sempre di più a favore dell'energia a mano a mano che si avvicinerà la fase finale di ingrasso. Per ottenere mangimi con un elevato livello di energia bisognerà ricorrere a elevati livelli di grassatura prestando molta attenzione a quale fonte lipidica utilizzare in modo da mantenere il livello dell'acido linoleico al di sotto della soglia indicata dal disciplinare (< 2%). Dove possibile si dovrebbero differenziare le formulazioni dei mangimi in funzione del sesso, in quanto le femmine sono al contrario dei maschi animali non castrati e per questo motivo depositano grasso con maggiore lentezza pertanto dovrebbero ricevere diete ancora più ipoproteiche e iperenergetiche rispetto ai maschi. Sempre grande importanza riveste la granulometria del mangime che dovrà avere il giusto compromesso al fine di migliorarne la digeribilità senza però far aumentare i rischi delle ulcere gastriche. Un altro argomento di grande importanza per ottimizzare l'alimentazione del suino è il monitoraggio delle materie prime utilizzate per la produzione dei mangimi, questo perché i valori nutrizionali delle materie utilizzate devono essere considerati una variabile e non una costante, questa attenzione deve essere massima soprattutto per le materie contenute in grande quantità all'interno del mangime o comunque in grado di influenzarne il profilo lipidico o amminoacidico. Questo aspetto riguarda in particolar modo i nutrizionisti che non devono mai dimenticare di verificare la congruenza dei valori dei nutrienti nel data base dei programmi di formulazione con quelli reali delle materie utilizzate.

GESTIONE DEI PASTI

Per quanto riguarda la gestione dei pasti cominciamo con una considerazione su un'indicazione contemplata dal disciplinare delle produzioni DOP il quale recita che l'alimento dovrebbe essere preferibilmente presentato in forma liquida e, per tradizione, con siero di latte. Questo però non è tassativo e in ogni caso se la forma di presentazione sarà a broda o pastone dovremo ricordarci di valutare se si tratta di sistemi a volontà o razionati un particolare di non poco conto al fine di ottenere la massima ingestione punto cruciale per ridurre le incidenze di animali troppo magri. Nei sistemi razionati dovremo preoccuparci di mettere tutti gli animali in condizione di alimentarsi nello stesso momento e con uguali possibilità di accesso al trogolo, ad esempio prevedendo lo scarico della broda in due momenti successivi distanziati di alcuni minuti. Al fine di ottenere alti livelli di ingestione dovremo inoltre pensare di distribuire l'alimento almeno tre volte al giorno rispettando una distanza tra i pasti di almeno cinque ore. Dovremo inoltre fare attenzione al rapporto di diluizione del mangime in modo da non aumentare troppo il volume della broda che l'animale deve ingerire in un solo pasto cosa che potrebbe limitarne la capacità di ingestione in sostanza secca. Molti allevamenti sono dotati di sistemi di distribuzione della broda computerizzati che sono dotati di curve di alimentazione e quindi in grado di controllare le quantità di mangime distribuite ogni giorno ad ogni singolo box. Questo non ci pone al riparo dai problemi legati ad una iper/ipoalimentazione ma al contrario se non viene applicato un attento controllo dei trogoli al momento dei pasti avremo l'elevato rischio o di sprecare mangime e quindi di non ottenere le conversioni migliori o se sottoalimentati di non ottenere le migliori performance e di non ottenere le crescite in massa grassa come ci richiede il disciplinare. Anche l'utilizzo di razioni con un livello di fibra troppo elevato possono essere responsabili di ingestioni ridotte cosa da evitare soprattutto nelle fasi di finissaggio. Nei sistemi di distribuzione automatica l'utilizzo di curve di alimentazione impostate al fine di ottimizzare le conversioni potranno sicuramente portarci ad un ottimo risultato sotto il profilo delle rese alimentari ma anche in questo caso ad esporci ad un elevato rischio di non far depositare adeguate quantità di grasso di copertura. Dal momento che il disciplinare delle DOP non ci obbliga di utilizzare una alimentazione

a bagnato in alcuni allevamenti possiamo trovarci di fronte ad una alimentazione a secco o mangia e bevi, in questi casi dovremo preoccuparci di mettere a disposizione degli animali una adeguata quantità di abbeveratoi, in quanto una eventuale carenza di fonti di acqua può determinare una importante diminuzione delle ingestioni e allo stesso tempo dovremo mettere a disposizione degli animali un fronte mangiatoia di almeno 8 cm. per ogni capo presente nel box (es. venti capi, 1.6 metri). Altri accorgimenti utili a ridurre i problemi alla macellazione legati alla griglia EUROP sono legati alla possibilità di ricorrere nelle fasi di ingrasso alla divisione tra maschi e femmine e magari con la somministrazione di mangimi diversi tra i due sessi, ricordiamoci, infatti, che quando parliamo di suini maschi in Italia parliamo di animali castrati e quindi di animali che hanno molte più probabilità di depositare grasso, questo per ovvi motivi ormonali. Inoltre al fine di ridurre alla macellazione la presenza di capi in categoria L (peso della carcassa < 110,00 kg) risulta molto utile effettuare il pareggiamento dei soggetti all'interno dei box nel modo più accurato possibile e magari fatto il più tardi possibile.

BENESSERE

Per ottenere il miglior risultato relativamente agli accrescimenti e alle conversioni alimentari non possiamo esimerci dal rispettare le condizioni del benessere animale questo non solo per motivi etici ma anche e soprattutto per una questione economica e di qualità della carcassa. Il primo dogma da rispettare è senza ombra di dubbio lo spazio al trogolo, non dovremmo mai scendere sotto i 38 cm. di fronte trogolo per capo questo ovviamente nel caso di alimentazione razionata, nel caso di sessaggio saranno 40 cm. per i maschi e 36 cm. per le femmine. Il secondo punto da rispettare è la densità che dovrà essere di almeno 1 m^2 per capo ovviamente esclusa la eventuale presenza di aree esterne al capannone e la superfice del trogolo. Dobbiamo inoltre essere certi della libera disponibilità di acqua, questo perché il suino è un animale che ha gravi difficoltà nello smaltire il calore e la libera disponibilità dell'acqua è l'unico sistema per poter sopportare le alte temperature, in caso contrario osserveremo nei periodi estivi dei gravi cali di ingestione, con ovvie ripercussioni sugli accrescimenti, non per niente i pesi medi di macellazione a settembre risultano essere sempre più bassi e le mezzene più magre rispetto agli altri mesi dell'anno. Altra buona norma di benessere è l'igiene dei trogoli, troppe volte a causa dell'utilizzo di sistemi di distribuzione automatica dei pasti la verifica della pulizia degli stessi prima dei pasti non viene verificata ciò comporta che alle estremità dei trogoli possano essere presenti importanti quantità di feci e urine che se non asportate limitano lo spazio realmente a disposizione al trogolo. Altra verifica da compiere è la capacità dei trogoli, infatti, se ci si limita alla distribuzione di due pasti giornalieri magari con rapporto di diluizione elevato si può incorrere nel problema che la quantità da somministrare sia superiore alla capacità di contenimento dei trogoli. Altro aspetto legato al benessere degli animali è legato alla coibentazione dei capannoni, ed è proprio attraverso l'isolamento termico delle strutture che il mantenimento di temperature ambientali corrette diventa economicamente sostenibile, se metteremo i suini nel intervallo di temperatura corretta tutto l'anno le loro performance saranno al meglio in ogni stagione.

SANITÀ

Altro punto cruciale per ottenere buoni risultati in allevamento e di conseguenza buone caratteristiche al macello è senza paura di smentite il buon livello sanitario, non è, infatti, possibile ottenere risultati di eccellenza se lo stato di salute degli animali è compromesso. Dovremo pertanto preoccuparci di prevenire nel miglior modo possibile tutte le patologie, ma in modo particolare di quelle ad andamento cronico in quanto presenti per lunghi periodi e

quindi in grado di alterare le performance per un tempo prolungato. Dobbiamo per l'ennesima volta ricordarci che il concetto del tutto pieno tutto vuoto è il punto cruciale per provare ad interrompere la perpetuazione all'infinito dei problemi sanitari presenti in un allevamento. Per quanto riguarda le patologie di tipo non infettivo e mi riferisco alle invalidità podali particolare attenzione dovrà essere posta al tipo e all'aggressività della pavimentazione di stabulazione.

GENETICA

La scelta del tipo genetico da allevare ha un'importanza straordinariamente grande al fine del risultato sia in allevamento sia al macello, però contrariamente ai precedenti aspetti questa volta le strade non coincidono ed è per questo motivo che la scelta da compiere deve essere molto ponderata e consapevole. Iniziamo dicendo che per questo aspetto il disciplinare delle DOP pone molte limitazioni che non elencheremo, ma che in linea di massima indicano come utilizzabili quei tipi genetici che sono in grado di depositare buone quantità di grasso. Il problema però è che questi tipi genetici, che ci abbassano la probabilità di avere carcasse non conformi al macello e mi riferisco a quelli in categoria E della griglia, sono anche i tipi genetici dalle più alte possibilità di crescita e soprattutto in grado di avere indici di conversione alimentare più efficiente che in sostanza sono le caratteristiche più importanti al fine del ritorno economico per l'allevatore. Dopo queste considerazioni possiamo dire che la scelta del tipo genetico deve essere fatta in funzione di ottenere un prodotto che rispetti nel limite del possibile quanto richiesto dal disciplinare delle DOP senza però dimenticare che la sopravvivenza economica delle aziende ha una stretta correlazione con le buone performance di crescita e conversione, soprattutto se l'industria di macellazione non è disponibile a riconoscere prezzi differenziati per coloro che si mostrano in grado di fornire un prodotto dalle caratteristiche migliori per la trasformazione in prodotti DOP.

CONCLUSIONI

L'introduzione della griglia EUROP anche in Italia ha senza dubbio portato nuovi problemi al settore allevamento ma visto che era una scelta oramai ineludibile agli occhi dei partner europei e che oltretutto ha per il momento portato aumenti sui prezzi di vendita dei suini non possiamo che dare il benvenuto a questo "nuovo" metro di valutazione delle carcasse. Queste ulteriori difficoltà di gestione devono essere per noi tecnici e consulenti affrontate come sempre nel più professionale dei modi al fine di raggiungere i risultati che il mondo degli allevatori e l'intera filiale di produzione ci richiedono affinché il settore suinicolo italiano possa non solo sopravvivere ma poter tornare a prosperare.

FATTORI DI RISCHIO E PREVENZIONE DELLA ZOPPIA NEL SUINO

WENDT M.

Clinic for Swine and Small Ruminants, Forensic Medicine and Ambulatory Service
University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany

I segni clinici di zoppia e i sintomi neurologici vengono osservati frequentemente negli allevamenti suini. La zoppia è una delle più importanti cause di riforma nei riproduttori, ma può anche essere osservata nei suini in pre-svezzamento e post-svezzamento, così come nei suini da ingrasso. Dal momento che la zoppia è sempre associata a dolore e disagio, che possono portare a riduzione della produttività, essa rappresenta un problema notevole per il benessere animale, nonché un grave problema economico per la produzione suinicola. Le cause di zoppia possono essere molteplici e dipendono in gran parte dagli organi interessati (sistema muscolo-scheletrico / neurologico) e dalla fascia di età coinvolta.

Pre-svezzamento

Le condizioni più comuni che causano disturbi locomotori nei suinetti in pre-svezzamento sono lesioni della pelle e dei piedi, artrite / poliartrite e splayleg. Condizioni meno frequenti possono essere anomalie congenite / ereditarie come sindattilia, polidattilia, artrogriposi o iperostosi. Iniezioni fatte a livello dei muscoli del quarto posteriore possono provocare paresi degli arti posteriori o infezione da clostridi. Il rischio di incidenza di zoppia è più alto nella prima settimana di vita e diminuisce in modo continuativo fino allo svezzamento (Zoric 2010).

Lesioni cutanee e del piede

Le lesioni cutanee nei suinetti sono solitamente bilaterali e vengono per lo più osservate sottoforma di abrasioni sulle articolazioni carpali. Le tipiche lesioni del piede nei suini in pre-svezzamento sono ecchimosi sui calcagni, erosioni della suola e lesioni del cercine coronario. Se l'infezione penetra verso l'interno, può dar luogo ad un'artrite settica delle articolazioni del piede. La prevalenza e la gravità delle lesioni cutanee e del piede sono maggiori nei primi giorni di vita e declinano dopo il giorno 10, e la maggior parte tende a scomparire allo svezzamento. Tali lesioni sono fortemente influenzate dal tipo e dalle condizioni della pavimentazione. Per valutare i fattori di rischio per una determinata pavimentazione, devono essere innanzitutto valutate le reali condizioni del pavimento. Su pavimenti pieni in cemento una maggior incidenza di lesioni potrebbe essere osservata se il cemento è vecchio, quando la superficie è erosa ed è quindi ruvida. Le lesioni potrebbero essere ridotte utilizzando un'abbondante lettiera (paglia, torba) o riparando la pavimentazione. I suinetti allevati su pavimenti parzialmente o completamente fessurati hanno mostrato più lesioni su reticolati elettrosaldati smussati e su barre di metallo piatte piuttosto che su travetti di plastica (Moutotou et al. 1999, Kilbride et al. 2009, Zoric 2010). Solo poche lesioni compaiono in suini allevati su pavimentazioni rivestite con filo metallico intrecciato ricoperto di plastica. Le lesioni del cercine coronario sono particolarmente influenzate dall'ampiezza della fessura tra i travetti: aumentano se la dimensione e la forma della fessura sono grandi rispetto alle dimensioni del piede del suinetto (Wechsler 2005). Le linee guida per l'allevamento del suino consigliano una larghezza massima delle fessure compresa tra i 9 e gli 11 mm. Un altro importante fattore che contribuisce alle lesioni cutanee e del piede è il comportamento dei suinetti alla poppata. Le lesioni tendono a presentarsi e ad essere più gravi quando la scrofa soffre di ipo/agalassia o

quando il numero di capezzoli non è adeguato al numero dei nati e c'è quindi una concorrenza più aggressiva per i capezzoli (Smith e Mitchell 1976). I suinetti allevati all'aperto presentano solitamente un'incidenza molto bassa di patologie del piede e degli arti rispetto a quelli allevati al chiuso (Kilbride et al. 2009).

Artrite / poliartrite

I casi di artrite o poliartrite nei suinetti sono causati da batteri ubiquitari come *Streptococcus spp, Staphylococcus spp, Escherichia coli* o *Arcanobacterium pyogenes* (Nielsen et al. 1975, Zoric 2010). I batteri possono entrare attraverso le ferite della pelle, l'ombelico o le tonsille, e poi diffondere per via ematogena. Pertanto, fattori di rischio importanti possono essere: un livello igienico scarso in generale e durante manipolazioni chirurgiche sul suinetto (castrazione, taglio della coda, taglio dei denti), così come onfaliti e ipogalassia della scrofa, che portano indirettamente a lesioni cutanee dei suinetti (abrasioni, morsi). Inoltre anche l'immunità materna può avere un ruolo, poiché suinetti nati da scrofette soffrono più spesso di poliartrite rispetto alle nidiate di scrofe più vecchie (Nielsen et al. 1975). Anche l'incidenza di artrite / poliartrite è poi influenzata dal tipo di pavimentazione, i suinetti allevati su pavimenti parzialmente fessurati con lettiera e su pavimenti completamente fessurati mostrano più sintomi riferibili a artrite/poliartrite rispetto a quelli su pavimentazioni piene in cemento con lettiera. L'incidenza risulta più elevata su pavimenti ruvidi e rovinati rispetto ai pavimenti lisci e regolari (Kilbride et al. 2009).

Le misure preventive contro lesioni cutanee, lesioni del piede e artrite / poliartrite comprendono quindi: l'ottimizzazione delle condizioni della pavimentazione e dello stato igienico, soprattutto durante le manipolazioni chirurgiche (disinfezione degli strumenti e delle ferite), così come il trattamento e la prevenzione della condizione di ipo/agalassia delle scrofe.

Splayleg

Lo splayleg è una importante condizione congenita dei suinetti associata ad ipoplasia miofibrillare e sintomi clinici di paralisi e immobilità. E' stata descritta l'associazione tra splayleg e diversi fattori di rischio, tuttavia, l'eziologia e la patogenesi non sono ancora del tutto chiari. Si è spesso discusso del potenziale ruolo dell'ereditabilità nell'eziologia di splayleg, ma una ricerca tedesca basata sui dati riguardanti 47.323 nidiate di 351 verri German Landrace e 1.134 verri Pietrain negli anni 1982-2000 ha mostrato che la frequenza di splayleg non diminuita in questo periodo per la selezione (Beißner et al. 2003). Un sondaggio riguardante un popolazione di Large White-Landrace in Nebraska ha rilevato che l'ereditabilità (h^2) diretta e materna era di 0,07 e 0,16, rispettivamente, analizzando 37.673 dati di suini di 6 linee diverse (Holl e Johnson 2005). Lo splayleg viene osservato più frequentemente nei maschi che nelle femmine e nei suinetti con basso peso alla nascita (Vogt et al. 1984, Holl e Johnson 2005). E' stato riportato che la probabilità di suini con splayleg è influenzata dai caratteri della madre (aumento delle dimensione della nidiata, raggiungimento della pubertà in giovane età, minor numero di capezzoli, ridotta sopravvivenza embrionale al g 50, consanguineità della madre) (Holl e Johnson 2005). Anche la durata della gestazione può influenzare l'incidenza di splayleg. L'induzione al parto al giorno 112 ha portato a un maggior numero di suinetti colpiti rispetto al giorno 114 (Boelcskei et al. 1996). Alcuni ricercatori suggeriscono che lo splayleg potrebbe rappresentare una forma congenita della miopatia da glucocorticoidi conseguente allo stress e allo squilibrio ormonale delle scrofe gravide che colpisce poi i feti. L'ipoplasia miofibrillare è stata indotta sperimentalmente in suinetti di scrofe Landrace belga mediante un trattamento delle scrofe con desametasone durante la gravidanza, ma le lesioni istopatologiche sono state osservate in assenza di sintomi clinici. Le differenze con i suinetti con sintomatologia clinica di splayleg includevano la maturità delle miofibrille e il grado di degradazione del glicogeno autofagosomale (Jirmanová 1983, Ducatelle et al. 1986). Nei suinetti

con splayleg la mielinizzazione delle fibre nel midollo spinale lombare che innervano i muscoli degli arti posteriori è rallentata (Szalay et al. 2001). Carenze di aminoacidi come la colina e la metionina che sono essenziali per la normale produzione di mielina possono essere una potenziale causa di splayleg (Cunha 1968). Tuttavia, altri studi hanno confutato questa ipotesi, dimostrando che un apporto sufficiente nella razione giornaliera delle scrofe non ha evitato i casi di splayleg (Dobson 1971, Iben 1989). Il verificarsi di micotossicosi da *Fusarium* può essere associato ad un aumento del numero di suinetti con splayleg (Alexopoulos 2001). Il tipo e la scivolosità del pavimento sono stati valutati come ulteriori fattori di rischio per splayleg (Christison et al. 1987), ma non sono stati confermati come tali da altri studi (Van der Heyde et al. 1989).

Per evitare che si verifichino casi di mielinizzazione immatura e ipoplasia miofibrillare si dovrebbe evitare un parto anticipato (induzione del parto adeguata, applicazione di altrenogest (giorno 111-113), vaccinazione per PRRS).

Suini svezzati e in accrescimento, scrofe riproduttrici

Le cause di zoppia nei suini svezzati e in accrescimento così come nelle scrofe riproduttrici sono indicate in tabella 1.

Tab.1 Malattie con zoppia / paresi in suini svezzati, suini in crescita e scrofe da riproduzione

Infettive	**Non infettive**
virali	**metaboliche**
afta malattia vescicolare esantema vescicolare stomatite vescicolare infezioni da Tescovirus	rachitismo, osteomalacia distrofia muscolare (deficienza di vitamina E/selenio)
batteriche	**Tossiche**
Streptococcus suis *Haemophilus parasuis* *Mycoplasma hyorhinis* *Mycoplasma hyosynoviae* *Erysipelothrix rhusiopathiae* altri *Strep. spp., Staph. spp.* *Arcanobacterium pyogenes* *Brucella suis* *Mycobacterium tuberculosis* *Clostridium tetani* *Clostridium septicum*	laminiti conseguenti a tossicosi da - selenio - vitamina D - vitamina A - organofosfati
	Degenerative
	osteocondrosi epifisiolisi apofisiolisi
	Traumatiche/da ferite fisiche
	fratture dislocazioni storte contusioni muscolari strappi muscolari peribursiti lesioni ungueali
	Ereditarie/congenite
	necrosi del muscolo del dorso

Cause infettive

Mentre le infezioni virali elencate sono fortunatamente eventi rari, frequenti casi di disordini locomotori nei giovani suini (svezzati, magroni, scrofette) sono associati a differenti infezioni batteriche che causano poliartrite e altri sintomi (*S. suis, H. parasuis, M . hyorhinis, M. hyosynoviae, E. rhusiopathiae*). Il fattore di rischio più importante associato a questi disordini è una scarsa immunità a livello di allevamento. L'introduzione di suini portatori sani di ceppi virulenti in un allevamento naïve o mettere insieme suini di allevamenti con stato immunitario differente, può portare al verificarsi di patologie e di conseguenza a ingenti danni economici. Un gruppo nuovo di riproduttori proveniente da un allevamento con un differente background sanitario dovrebbe essere isolato per un periodo di acclimatamento abbastanza lungo da consentire lo sviluppo di immunità protettiva sia da vaccinazione che da esposizione naturale. Inoltre ai suinetti dovrebbe essere garantito un apporto sufficiente di colostro e quindi di anticorpi materni durante le prime 24-36 ore.

Molti suini sono portatori nel tratto respiratorio superiore di ceppi infettivi di batteri che causano anche poliartrite, senza presentare sintomi clinici fino a quando fattori di stress (sovraffollamento, scarsa ventilazione, variazioni eccessive della temperatura eccessiva, raggruppamento di suinetti con più di 2 settimane di differenza di età tra loro, spazi di abbeverata o disponibilità di acqua inadeguati) possono scatenare un focolaio clinico (Dee et al. 1993). Pratiche di gestione quali il tutto pieno/tutto vuoto, la divisione di grandi edifici in ambienti più piccoli, nonché la pulizia e la disinfezione dei locali tra gruppi diversi di suini, può aiutare a ridurre l'incidenza delle malattie. L'uso delle pratiche di MEW (Medicated Early Weaning- svezzamento precoce "medicato") e SEW (Segregated Early Weaning- svezzamento precoce "segregato") è discutibile nel caso di colonizzatori precoci, come *S. suis* e *H. parasuis*. L'esposizione controllata dei suinetti a basse dosi di ceppi circolanti prevalenti durante il periodo nel quale i suini sono ancora protetti dagli anticorpi materni è stata proposta come una tecnica alternativa per controllare questi batteri (Oliveira et al. 2004).

Il controllo efficace della malattie viene spesso ottenuto mediante vaccinazione con vaccini batterici commerciali o autogeni. Il fallimento della vaccinazione può essere dovuto alla mancanza di cross-protezione nei confronti del ceppo / sierotipo, alla presenza di più di un ceppo / sierotipo o all'introduzione di un nuovo ceppo / sierotipo nell'allevamento. I ceppi isolati da nuovi casi clinici dovrebbero essere sottoposti a genotipizzazione e confrontati con quelli presenti nel vaccino (Oliveira et al. 2004). Tempi e gestione della vaccinazione devono inoltre essere adeguati.

L'artrite / poliartrite purulenta da Streptococchi, Stafilococchi o *Arcanobacterium pyogenes* è di solito meno frequente che nei suini lattanti. Casi clinici di brucellosi o tubercolosi possono occasionalmente apparire clinicamente sottoforma di discospondilite associata a paralisi posteriore o artrite nei suini di qualunque età.

Cause non infettive

Le cause non infettive di zoppia includono carenze nutrizionali e tossicosi. Con le moderne formulazioni alimentari le carenze reali (Ca, P, vitamina D, vitamina E, selenio) derivanti da carenze alimentari dovrebbero essere insolite. In realtà, i problemi di carenza si verificano comunque a causa di uno stoccaggio scorretto, o di una scorretta somministrazione dell'alimento o a causa di interazioni che riducono la disponibilità al suino. In confronto alle carenze di Ca o di vitamina D, la carenza di fosforo può verificarsi con maggiore frequenza, perché sono molti i fattori che influenzano la digeribilità del P (l'origine del mangime, la concentrazione di fitati e del P totale e la presenza di fitasi). Le tossicità derivano di solito da

errori di miscelazione nella produzione dei mangimi (selenio, vitamina D, vitamina A) o dalla contaminazione dei mangimi in azienda (organofosfati). Osteocondrosi e lesioni ungueali sono le cause non infettive più frequenti di zoppia e vengono osservate spesso nei magroni e nei suini da riproduzione, e quindi verranno discusse in modo più dettagliato di seguito.

Osteocondrosi

Mentre i cambiamenti primari di osteocondrosi nei suini si osservano comunemente a circa 2 mesi d'età, i sintomi clinici di zoppia normalmente non sono ancora evidenti a questa età. I disturbi locomotori causati da osteocondrosi non vengono normalmente osservati fino a 4 mesi di età e possono essere colpiti suini fino a 18 mesi. L'osteocondrosi è caratterizzata da un disturbo nella ossificazione dei centri epifisari e apofisari. La vitalità della cartilagine epifisaria è fortemente dipendente da un adeguato apporto di sangue da parte dei vasi del canale vascolare cartilagineo. La necrosi dei vasi del canale cartilagineo porta ad una necrosi della cartilagine epifisaria e rappresenta l'evento morfologico iniziale dell'osteocondrosi. Solitamente le lesioni tipiche di osteocondrosi non sono generalizzate, ma focali. Tuttavia, l'osteocondrosi può avvenire con localizzazione multifocale nello stesso individuo e spesso con lesioni a simmetria bilaterale (Calson et al. 1991, Ytrehus et al. 2007).

Per lo sviluppo di osteocondrosi vengono descritte tre fasi. La presenza di un'area focale di necrosi cartilaginea, limitato alla cartilagine epifisaria viene definita come osteocondrosi latente, mentre viene definita osteocondrosi manifesta la presenza di un danno focale dell'ossificazione endocondrale già visibile all'esame macroscopico e radiografico. Se si forma una fessurazione a livello di cartilagine necrotica e si estende attraverso la cartilagine articolare, la lesione viene definita osteocondrosi dissecante (Ytrehus et al. 2004).

Sono vari i fattori che possono contribuire allo sviluppo di osteocondrosi:

<u>*Rapida crescita*</u>: a causa della pressione economica, il tasso di crescita dei suini dalla nascita alla macellazione è aumentato costantemente negli ultimi decenni, ed è un'ipotesi sempre più riportata che una rapida crescita, dovuto alla sovralimentazione e a caratteri ereditabili, sia coinvolta nello sviluppo di osteocondrosi. D'altra parte però, i ricercatori non hanno ancora dimostrato alcuna correlazione tra tasso di crescita e lesioni tipiche di osteocondrosi né abbassando l'apporto alimentare, né valutando suini con tassi di crescita geneticamente inferiori (Carlson et al. 1988, Uhlhorn et al. 1995). Pertanto, potrebbe essere necessario valutare il tasso di crescita non solo dalla nascita alla macellazione, ma in tempi diversi. Lundeheim (1987) ha rilevato che suini con segni clinici di osteocondrosi alla macellazione avevano incrementi di peso elevati nei primi anni di vita, ma erano poi cresciuti più lentamente in prossimità del peso di macellazione a causa di disagio e dolore dovuto allo sviluppo di gravi lesioni di osteocondrosi.

<u>*Ereditarietà*</u>: le differenze nella prevalenza di osteocondrosi tra diverse razze e linee genetiche indicano che è presente una componente ereditaria, ma le stime di ereditabilità variano notevolmente. Le caratteristiche anatomiche possono rappresentare un potenziale fattore ereditario. E' stato suggerito che una forma sfavorevole delle articolazioni che crea un sovraccarico locale sia un'importante causa di osteocondrosi. La lunghezza della carcassa e il peso relativo delle cosce sono altri tratti che sono stati correlati a lesioni di osteocondrosi (Grøndalen 1974, van der Wal et al. 1980). Vari loci di caratteri quantitativi (QTL) significativi per osteocondrosi sono stati descritti recentemente su diversi cromosomi (Anderson-Eklund et al. 2000, Christensen et al. 2010, Uemoto et al. 2010, Laenoi et al. 2011). E' stato sviluppato un database chiamato PigQTLdb, in cui sono inseriti i QTL per aiutare i ricercatori a condividere i dati pubblicati. Kardamideen et Janss (2005) hanno riportato risultati significativi che indicano che l'osteocondrosi non è solo soggetta ad eredità poligenica, ma è anche influenzata da un gene maggiore, che può quindi rappresentare un'opportunità per la selezione genetica contro

questa malattia. La maggior parte degli studi si sono concentrati sulla ultime fasi della malattia (osteocondrosi manifesta e dissecante). I risultati potrebbero essere diversi se venissero valutate lesioni più precoci, dal momento che queste hanno meno probabilità di essere influenzate da fattori coinvolti nella progressione a lungo termine della malattia (Ytrehus et al. 2007). La Matrix gamma-carboxyglutamate (Gla)-protein (MGP) è un potenziale inibitore della calcificazione della matrice extracellulare e potrebbe contribuire allo sviluppo di osteocondrosi. La down-regulation della MGP è stata riportata in suini con osteocondrosi rispetto ad animali sani, il che rende il gene MGP un gene candidato per lo sviluppo della malattia (Laenoi et al. 2010).
Trauma: il ruolo del trauma come un fattore di rischio per osteocondrosi può dipendere dallo stadio della malattia. Un trauma grave potrebbe avere un ruolo nella progressione delle lesioni da osteocondrosi manifesta a lesioni di osteocondrosi dissecante, mentre i microtraumi che colpiscono i vasi sanguigni del canale della cartilagine ossea a livello di giunzione condro-osteale in una certa fascia di età, può essere un evento di avvio alla formazione di lesioni (Ytrehus et al. 2007).
Fattori alimentari: diversi studi, indagando il ruolo delle carenze di minerali (Ca, P) e vitamine (A, C, D) come un fattore di rischio per l'osteocondrosi, hanno dimostrato che esiste una correlazione significativa (Reiland 1978, Nakano et al. 1983, Reiland et al. 1991). D'altro canto, è stato dimostrato che diete contenenti ingredienti che sono coinvolti nel metabolismo della cartilagine e delle ossa (Cu, Mn, Si, metionina, treonina, prolina, glicina) hanno ridotto la gravità delle lesioni di osteocondrosi. Tuttavia, non é chiaro se questi ingredienti possano prevenire la formazione di nuove lesioni o provocare la regressione delle lesioni esistenti (Frantz et al. 2008).

La selezione contro l'osteocondrosi sembra essere l'ipotesi migliore per la prevenzione della malattia in futuro. Ci si può aspettare solo un'efficacia limitata da altri mezzi quali la riduzione del tasso di crescita, il miglioramento delle condizioni di stabulazione per evitare traumi o l'ottimizzazione della composizione dei mangimi.

Lesioni ungueali
I suini in accrescimento e gli adulti hanno spesso zoppie causate da infortuni, soprattutto a carico degli unghioni. Le lesioni possono essere limitate all'unghia o possono permettere l'ingresso a infezioni che diffondono poi verso l'alto a intaccare una o più articolazioni. Studi condotti in alcuni allevamenti di scrofe hanno evidenziato un'alta prevalenza di lesioni ungueali. Oltre il 96% delle scrofe macellate che erano allevate in stabulazione libera e l'80% di quelle confinate presentavano almeno una lesione a livello delle dita laterali posteriori (Gjein e Larssen 1995). Le dita laterali posteriori sono quelle con il maggior numero di lesioni associate a zoppia nelle scrofe, e molte delle lesioni sembrano correlate all'ordine di parto della scrofa (Bradley et al. 2007). Le scrofe stabulate in box con alimentatori elettronici hanno mostrato una maggiore probabilità rispetto a quelle stabulate in gabbia di avere lesioni a carico delle varie dita (Anil et al. 2007).
- Fisiologicamente le dita mediali sono leggermente più piccole di quelle laterali. Forti discrepanze nelle dimensioni (ipoplasia del dito mediale) possono portare ad un sovraccarico del dito laterale seguito da lesioni del piede o crescita eccessiva del tallone. Si ipotizzano influenze genetiche sul verificarsi di ipoplasia; si dovrebbe quindi fare selezione sulle linee genetiche affette da ipoplasia.
- La crescita eccessiva dello strato corneo di rivestimento delle dita è solitamente dovuta alla stabulazione su terreni fangosi o su lettiere troppo profonde. La mancanza di movimento può essere un altro fattore di rischio, se i suini sono allevati in piccoli recinti sovraffollati, in gabbie singole o su pavimenti scivolosi (pavimento bagnato, travetti in plastica). Un cambiamento di

postura con spostamento del peso dovuto ad una condizione dolorosa può portare a un'eccessiva crescita di un solo unghione. Conseguentemente all'eccessiva crescita, si possono osservare un sovraccarico del tallone ed anche erosioni del tallone e lesioni di unghioni e unghielli. Un'attività fisica adeguata e il trattamento della superficie del pavimento per diminuirne la scivolosità possono aiutare ad evitare una crescita eccessiva delle unghie.
- Lesioni del cercine coronario possono svilupparsi se la larghezza della fessurazione del pavimento è inadeguata, o quando sono presenti nell'ambiente bordi taglienti o gradini. L'invasione batterica secondaria porta a un'infiammazione flemmonosa e all'ulcerazione della corona (laminite settica) e può raggiungere il tendine flessore profondo o alle ossa o alle articolazioni delle falangi (flemmone interdigitale). Altre lesioni degli unghioni (erosioni della suola e del tallone, fessure della parete, distacchi a livello della linea bianca) possono rappresentare ulteriori punti d'entrata per infezioni batteriche seguite dallo sviluppo di flemmone interdigitale.
- Fessurazioni a livello della parete verticale e orizzontale, della linea bianca, o tra suola e tallone e tallone e parete sono associate a zoppia dolorosa se il corion viene irritato o infettato. Le aree predisposte per la formazione di fessure sono le zone marginali nelle quali convergono il tessuto corneo più morbido (tallone) e più duro (suola, parete). I fattori di rischio per lo sviluppo di questo tipo di lesioni sono condizioni del pavimento (superficie ruvida, travetti rotti, fessure troppo ampie), rotazioni frequenti / movimenti improvvisi, in particolare durante il raggruppamento e i combattimenti per stabilire la gerarchia tra scrofe, unghioni troppo lunghi e qualità del tessuto corneo insufficiente (influenzata dalle condizioni alimentari e del pavimento (umidità, superfici fangose, profondità, lettiera umida portano a un tessuto corneo più morbido)).
- Erosioni di suola e tallone possono derivare dalla stabulazione dei suini su pavimenti troppo duri, abrasivi o da effetti chimici dovuti al cemento appena posato. Si può osservare zoppia, se sono presenti difetti del corion o pododermatite. L'abrasione è favorita dalla qualità insufficiente della scatola cornea (vedi sopra).

Le misure preventive per proteggere i suini da lesioni podali sono legate a diversi fattori:
Interventi zootecnici: controllare regolarmente le unghie e tagliare la crescita in esubero nella fase iniziale per evitare lesioni dolorose e zoppie.
Condizioni della pavimentazione: la superficie del pavimento deve essere antisdrucciolo e poco abrasiva. Pavimentazioni molto abrasive devono essere ri-posate, verniciate con resina o vernice in gomma, o possono essere utilizzati temporaneamente tappetini in gomma, per evitare erosioni a suola e tallone. Il cemento appena posato deve essere trattato con carbonato di sodio prima del primo contatto con gli animali. Per evitare che i pavimenti siano bagnati, la pendenza del pavimento deve essere sufficiente a far defluire i liquidi. I travetti che compongono il pavimento fessurato devono avere bordi levigati non taglienti e non dovrebbero presentare gradini, i travetti e l'ampiezza delle fessure devono essere correlate all'età dell'animale. Nella zona di movimento ai gradini dovrebbero essere preferiti pavimenti con una determinata inclinazione. I pavimenti fessurati presentano un rischio più elevato di zoppia nelle scrofe rispetto a quelli pieni (Heinonen et al. 2006).
Igiene: il pavimento deve essere asciutto e pulito per evitare effetti negativi sulla qualità del tessuto corneo e le superfici scivolose, feci, urine, così come una lettiera fangosa devono essere rimossi regolarmente; la fessurazione del pavimento deve essere adeguata per permettere il deflusso delle feci.
Clima all'interno dell'allevamento: il controllo della clima (temperatura, umidità, ventilazione) all'interno dell'allevamento è inoltre utile per evitare che i pavimenti siano bagnati, scivolosi, e freddi (Anil et al 2006).

Gestione della stabulazione: minimizzare i movimenti veloci e le torsioni improvvise caratteristici delle lotte per la gerarchia nelle scrofe allevate in gruppo, può diminuire il rischio di lesioni ungueali. Pertanto, dovrebbero essere utilizzati box specifici per il momento del raggruppamento delle scrofe (3-6 m² / scrofa, uno o due giorni, pavimento in cemento con lettiera di paglia). Il momento migliore per il raggruppamento è direttamente dopo lo svezzamento o 5 settimane dopo l'accoppiamento. Per mantenere stabile la gerarchia dei sotto-gruppi nella zona collettivo la struttura dei box e delle aree di riposo deve essere adeguata al numero delle scrofe per gruppo. Sarebbe utile anche fornire materiale manipolabile per ridurre al minimo situazioni di stress.
Alimentazione: i combattimenti possono essere ridotti favorendo un'assunzione di cibo individuale e indisturbata. Gli ingredienti dei mangimi possono influire sulla qualità del tessuto corneo. Gli aminoacidi contenenti zolfo (metionina / cistina; dose raccomandata: 3,6 g / kg di mangime per scrofe gravide, 5,6 g / kg di mangime per scrofe in lattazione) sono importanti per la produzione di cheratina. L'integrazione della dieta con biotina ha un effetto positivo sull'integrità dell'unghia (dose raccomandata: 0,2 (fino a 2,0) mg / kg di mangime), perché è coinvolta nella formazione della sostanza intercellulare cementante (ICS). ICS svolge un importante ruolo nella regolazione della idratazione della sostanza cornea. La carenza di biotina può portare a fragilità del tessuto corneo. Micronutrienti importanti che possono avere un'influenza sulla qualità del tessuto corneo, sono zinco, rame e manganese (dosi raccomandate: 50 mg / kg, 8-10 mg / kg e 20-25 mg / kg di mangime, rispettivamente) (Mulling et al 1999, Tomlinson. et al. 2004, Ausschuss für Bedarfsnormen 2006).
Selezione genetica: la selezione sulla base di caratteristiche quali una buona conformazione scheletrica e piedi e arti robusti e con appiombi corretti è necessaria per migliorare la salute delle unghie degli animali a livello di allevamento (Fan et al 2009). La selezione basata sulla docilità potrebbe prevenire i traumi causati da frequenti combattimenti.

Bibliografia:

Alexopoulos, C. (2001): Association of Fusarium mycotoxicosis with failure in applying an induction of parturition program with PGF2alpha and oxytocin in sows. Theriogenology 55,1746-1757

Andersson-Eklund, L., Uhlhorn, H., Lundeheim, N., Dalin, G., Andersson, L. (2000): Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar x large white intercross. Genet Res 75, 223-230

Anil, L., Anil, S.S., Deen, J., Baidoo, S.K., Walker, R.D. (2006): Effect of group size and structure on the welfare and performance of pregnant sows in pens with electronic sow feeders. Can J Vet Res.70, 128–136

Anil, S.S., Anil, L., Deen, J., Baidoo, S.K., Walker, R.D. (2007). Factors associated with claw lesions in gestating sows. J. Swine Health Prod.;15, 78–83

Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2006): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen, DLG-Verlag, Frankfurt /Main

Beißner, B., Hamann, H.,Distl, O. (2003): Prevalence of congenital anomalies of the pig breeds German Landrace and Pietrain in Bavaria. Zuechtungskd. 75, 101-114

Bölcskei, A., Bilkei, G., Biro, O., Clavadetscher, E., Goos, T., Stelzer, P., Bilkei, H., Wegmüller, S. (1996): Der Einfluss des Zeitpunktes der Partusinduktion auf das Auftreten der kongenitalen myofibrillären Hypoplasie – Kurzbericht aus der Praxis. Dtsch. tierärztl. Wschr. 103, 21 – 22

Bradley, C.L., Frank, J.W., Maxwell, C.V., Johnson, Z.B., Powell, J.G., Van Amstel, S.R., Ward, T.L. (2007): Characterization of claw lesions associated with lameness in the University

of Arkansas sow herd. Arkansas Anim. Sci. Dep. Report 2007, 106-110
Carlson, C.S., Hilley, H.D., Meuten, D.J., Hagan, J.M., Moser, R.L. (1988): Effect of reduced growth rate on the prevalence and severity of osteochondrosis in gilts. Am. J. Vet. Res. 49, 396–402
Carlson, C.S., Meuten, D.J., Richardson, D.C. (1991): Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. J. Orthop. Res. 9, 317-329
Christensen, O.F. , Busch, M.E., Gregersen, V. R., Lund, M.S., Nielsen, B., Vingborg, R.K.K., Bendixen, C. (2010): Quantitative trait loci analysis of osteochondrosis traits in the elbow joint of pigs. Animal 4:3, 417–424
Christison, G.I., Lewis, N.J., Bayne, G.R. (1987): Effects of farrowing crate floors on health and performance of piglets and sows. Vet. Rec. 121, 37 – 41
Cunha, T.J. (1968): Spraddle hindlegs may be a result of choline deficiency. Feedstuffs 40, 25-31
Dee, S.A., Carlson, A.R., Winkelman, N.L., Corey, M.M. (1993): Effect of management practices on the Streptococcus suis carrier rate in nursery swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 295-299
Dobson, K.J. (1971): Failure of choline and methionine to prevent splayleg in piglets. Aust. Vet. J. 47, 587-590
Ducatelle, R., Maenhout, D., Coussement, W., Hoorens, J.K. (1986): Spontaneous and experimental myofibrillar hypoplasia and its relation to splayleg in newborn pigs. J. Comp. Path. 96, 433-445
Fan, B., Onteru, S.K., Mote, B.E., Serenius, T., Stalder, K.J., Rothschild, M.F. (2009): Large-scale association study for structural soundness and leg locomotion traits in the pig. Genetics Selection Evolution 41, 14
Gjein, H., Larssen, R.B. (1995): Housing of pregnant sows in loose and confined systems--a field study. 2. Claw lesions: morphology, prevalence, location and relation to age. Acta Vet Scand. 36, 433-42
Grøndalen, T. (1974): Osteochondrosis and arthrosis in pigs. VII. Relationship to joint shape and exterior conformation. Acta Vet. Scand. Suppl. 46, 1–32
Heinonen, M., Oravainen, J., Orro, T., Seppä-Lassila, L,. Ala-Kurikka, E., Virolainen, J., Tast, A., Peltoniemi, O. A. T. (2006): Lameness and fertility of sows and gilts in randomly selected loose-housed herds in Finland. Vet. Rec. 159, 383-387
Holl, J.W., Johnson, R.K. (2005): Incidence of splayleg pigs in Nebraska litter size selection lines. J. Anim. Sci. 83, 34–40
Iben, H. (1989): Der Einfluss der Fütterung auf das Vorkommen der myofibrillären Hypoplasie neugeborener Ferkel. Univ. Vet Med. Hannover, Germany, Thesis
Jirmanova, I. (1983): The splayleg disease: a form of congenital glucocorticoid myopathy? Vet. Res. Commun. 6, 91-101
KilBride, A.L., Gillman,C.E., Ossent, P., Green, L.E. (2009): A cross sectional study of prevalence, risk factors, population attributable fractions and pathology for foot and limb lesions in preweaning piglets on commercial farms in England. BMC Vet. Res.; 5, 31.
Laenoi, W., Uddin, M.J., Cinar, M.U., Grosze-Brinkhaus, C., Tesfaye, D., Jonas, E., Scholz, A.M., Tholen, E., Looft, C., Wimmers, K., Phatsara, C., Juengst, H., Sauerwein, H., Mielenz, M., Schellander, K. (2011): Quantitative trait loci analysis for leg weakness-related traits in a Duroc x Pietrain crossbred population. Genet. Sel. Evol.43, 13
Laenoi, W., Uddin, M.J., Cinar, M.U., Phatsara, C., Tesfaye, D., Scholz, A.M., Tholen, E., Looft, C., Mielenz, M., Sauerwein, H., Schellander, K. (2010): Molecular characterization and methylation study of matrix gla protein in articular cartilage from pig with osteochondrosis. Gene 459, 24-31

Lundeheim, N. (1987): Genetic analysis of osteochondrosis and leg weakness in the Swedish pig progeny testing scheme. Acta agricult. Scand. 37, 159–173
Mouttotou, N., Hatchell, F.M., Green, L.E. (1999): The prevalence and risk factors associated with forelimb skin abrasions and sole bruising in preweaning piglets. Prev. Vet. Med. 39, 231-245
Mülling, C.K.W., Bragulla, H.H., Reese, S., Budras, K.D., Steinberg, W. (1999): How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. Anat. Histol. Embryol. 28, 103-108
Nielsen, N.C., Bille, N., Larsen, J.L., Svendsen, J. (1975): Preweaning mortality in pigs. 7. Polyarthritis. Nord. Vet. Med. 27, 529-543
Smith, W.J., Mitchell, C.D. (1976): Observation on injuries to suckled pigs confined on perforated floors with special reference to expanded metal. Pig J. 1, 91-104
Oliveira, S., Pijoan, C. (2004): Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet. Microbiol. 99, 1-12
Szalay, F.,·Zsarnovszky, A., Fekete, S., Hullár, I., Jancsik, V., Hajós, F. (2001): Retarded myelination in the lumbar spinal cord
of piglets born with spread-leg syndrome. Anat. Embryol. 203, 53–59
Tomlinson, D.J., Mülling, C.H., Fakler, T.M. (2004): Invited review: Formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. J. Dairy Sci. 87, 797–809
Uemoto, Y., Sato, S., Ohnishi, C., Hirose, K., Kameyama, K., Fukawa, K., Kudo, O., Kobayashi, E. (2010): Quantitative trait loci for leg weakness traits in a Landrace purebred population. Anim. Sci. J. 81, 28-33
Uhlhorn, H., Dalin, G., Lundeheim, N., Ekman, S. (1995): Osteochondrosis in wild boar-Swedish Yorkshire crossbred pigs (F2 generation). Acta Vet. Scand. 36,41–53
Van der Heyde, H., de Mets, J.P., Porreye, L., Henderickx, H., Calus ,A., Bekaert, H., Buysse, F. (1989): Influence of season, litter size, parity, gestation length, birth weight, sex and farrowing pen on frequency of congenital splayleg in piglets. *Livestock Prod. Sci.* 21, 143-155
van der Wal, P.G., van der Valk, P.C., Goedegebuure, S.A., van Essen, G. (1980): Osteochondrosis in six breeds of
slaughter pigs. II. Data concerning carcass characteristics in relation to osteochondrosis. Vet Quart. 2, 42–47
Vogt, D.W., Gipson, T.A., Akremi, B., Dover, S., Ellersieck, M.R. (1984): Associations of sire, breed, birth weight, and sex in pigs with congenital splayleg. Am. J. Vet. Res. 45, 2408–2409
Wechsler, B. (2005): An authorisation procedure for mass-produced farm animal housing systems with regard to animal welfare. Livestock Prod. Sci. 94, 71-79
Ytrehus, B., Carlson, C.S., Ekman, S. (2007): Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. Vet. Pathol. 44, 429–448
Ytrehus, B., Carlson, C.S., Lundeheim, N., Mathisen, L., Reinholt, F.P., Teige, J., Ekman, S. (2004): Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs--development with age, growth rate, weight and joint shape. Bone 34, 454-465
Zoric, M. (2010): Lameness in piglets. Pig J. 63, 1-11

ATTI DEL XXXVIII MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

Parma, 22-23 Marzo 2012

FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE DI LATTE E LO SVILUPPO MAMMARIO NEL SUINO

C. FARMER

Agriculture and Agri-Food Canada, Dairy and Swine R & D Centre, Sherbrooke, Québec, Canada

La produzione di latte da parte della scrofa è un fattore determinante per il tasso di crescita dei suinetti, in quanto rappresenta l'unica fonte di energia per il suinetto sottoscrofa,ed è influenzata da numerosi fattori quali la dimensione della nidiata, il numero di parti, l'alimentazione, la genetica, la gestione, l'ambiente e lo stato endocrino. Tuttavia, un fattore di notevole importanza, che però viene spesso trascurato, è lo sviluppo mammario. Infatti, la produzione di latte nella scrofa dipende dal numero di cellule che producono latte presenti a livello di ghiandole mammarie all'inizio della lattazione (Head and Williams citato da Pluske et al., 1995). E 'stato dimostrato che esiste una correlazione positiva tra contenuto di DNA (indicativo del numero di cellule) a livello di ghiandole mammarie e tasso di crescita dei suinetti (Nielsen et al., 2001). I periodi della vita della scrofa caratterizzati da una crescita mammaria relativamente elevata sono di particolare interesse in quanto è durante questi periodi che la crescita mammaria può essere influenzata da manipolazioni ormonali o nutrizionali. La mammogenesi (sviluppo della ghiandola mammaria) nei suini avviene in due stadi: durante la prepubertà, in scrofette a partire da un'età di 3 mesi, e durante l'ultimo terzo della gravidanza (Sørensen et al., 2002). Questi stadi sono controllati dalla complessa interazione di vari ormoni. Durante la gestazione, gli estrogeni (Kensinger et al., 1986) e la prolattina (Farmer et al., 2000) sono ormoni essenziali per lo sviluppo mammario, ai quali si aggiunge la relaxina (Hurley et al., 1991) che è necessaria per stimolare la crescita completa della ghiandola mammaria.

Sono pochissimi gli studi che hanno esaminato l'effetto di manipolazioni endocrine sulla mammogenesi. Uno di questi ha riportato che scrofette trattate con iniezioni di prolattina suina per un periodo di 28 giorni, a partire da 75 kg di peso corporeo, hanno avuto un maggiore sviluppo mammario, caratterizzato da una dilatazione del lume duttale e alveolare e dalla presenza di materiali secretorii (McLaughlin et al., 1997). È interessante notare che il grado di sviluppo della ghiandola mammaria non sembrava essere correlato alla dose di prolattina iniettata. Un ulteriore studio ha dimostrato che iniezioni di prolattina suina a scrofette per un periodo di 29 giorni, a partire da 75 kg di peso corporeo, erano in grado di stimolare lo sviluppo mammario e di alterare l'espressione dei geni correlati alla prolattina durante la pubertà (Farmer et al., 2005). Tuttavia, non è noto l'impatto di questo trattamento sulla successiva produzione di latte.

L'alimentazione influenza la mammogenesi, ma, ancora una volta, i dati sugli effetti della nutrizione sullo sviluppo della mammella nei suini sono scarsi. I risultati riguardanti gli effetti del livello alimentare durante la prepubertà sulla mammogenesi nella scrofette risultano controversi. Sørensen et al. (1998) e Le Cozler et al. (1998, 1999) hanno riportato che il livello alimentare delle scrofe nel periodo compreso tra 6 o 10 settimane di età e l'accoppiamento non ha influenzato la successiva produzione di latte. D'altra parte, nello studio di Kirchgessner et al. (1984) le scrofette sono state alimentate sia ad libitum che in regime razionato dallo svezzamento all'accoppiamento e i suinetti nati dal gruppo di scrofe con alimentazione razionata presentavano il tasso di crescita più alto al secondo parto (ma non al primo e al terzo). Tuttavia, quando

si fa specificatamente riferimento allo sviluppo della mammella, il livello alimentare sembra avere effetto, Farmer et al. (2004) riportano infatti che una restrizione alimentare del 20% di scrofette dai 90 giorni di vita fino alla pubertà ha ridotto drasticamente la massa del tessuto parenchimale mammario. Inoltre, Sørensen et al. (2006) hanno osservato che livelli alimentari elevati (alimentazione ad libitum vs razionata) a partire dai 90 giorni di età fino alla pubertà hanno stimolato lo sviluppo mammario. D'altra parte però, ridurre l'assunzione di proteine durante lo stesso periodo non ostacola lo sviluppo mammario nelle scrofette (Farmer et al., 2004). Recenti scoperte indicano che la composizione della dieta delle scrofette prepuberi influenza anche il loro sviluppo mammario. Scrofette la cui dieta è stata integrata con 2,3 g / giorno di fitoestrogeno genisteina da 3 mesi di età fino alla pubertà hanno presentato un aumento del numero di cellule mammarie a 183 giorni (Farmer et al., 2010). Ciononostante, l'integrazione alimentare con semi, farina, olio di lino durante la prepubertà ha indotto i cambiamenti attesi nei profili degli acidi grassi circolanti, senza provocare alcuna alterazione nello sviluppo mammario (Farmer et al. 2007b). Eppure, quando l'integrazione con un 10% di semi di lino è stata fornita dal giorno 63 di gestazione fino allo svezzamento, sono stati osservati effetti benefici sul tessuto mammario delle femmine delle nidiate di queste scrofe durante la pubertà (Farmer e Palin, 2008).

Durante la gestazione, un'alimentazione ad alto contenuto energetico può avere ripercussioni negative sullo sviluppo della mammella e quindi sulla produzione di latte (Weldon et al. 1991), mentre la quantità di proteine nella dieta ha effetti limitati sullo sviluppo mammario (Kusina et al. 1999a), ma può aumentare la successiva produzione di latte (Kusina et al. 1999b). D'altra parte, Howard et al. (1994) non hanno riscontrato alcun effetto di un elevato apporto energetico in gestazione sullo sviluppo mammario in scrofe gravide. Eppure, quando è stata modificata la composizione corporea di scrofette variando l'apporto proteico ed energetico durante la gravidanza, si è constatato che le scrofette grasse con una dieta ad alto contenuto energetico e basso contenuto proteico presentavano un ridotto sviluppo mammario e una minor produzione di latte rispetto alle scrofette magre allo stesso peso corporeo (Head and Williams, 1991 e 1995).

L'involuzione mammaria è un importante processo della ghiandola mammaria riguardo il quale resta ancora molto da imparare per la specie suina. Ford et al. (2003) hanno riportato che è associata a cambiamenti drammatici che si verificano rapidamente dai 7 ai 10 giorni dopo lo svezzamento, e Farmer et al. (2007a) hanno dimostrato che durante una lattazione prolungata (44 vs 22 giorni) le tight junction dell'epitelio mammario tendono a perdere adesione, fenomeno indicativo della comparsa del processo di involuzione. L'involuzione della ghiandola mammaria avviene anche nelle fasi iniziali della lattazione se le ghiandole non vengono stimolate dalla poppata dei neonati. Questa involuzione si verifica rapidamente, durante i primi 7-10 giorni di lattazione (Kim et al., 2001) ed è un processo irreversibile dopo 3 giorni di mancata suzione (Theil et al., 2005). Questi aspetti sollevano la questione dell'importanza dell'uso di un capezzolo nella fase iniziale della lattazione sulla sua produttività nella lattazione successiva. Questo punto è di grande interesse perché i produttori preferiscono non «sovra-utilizzare» le scrofe al primo parto per evitare la «sindrome della scrofa magra». Fraser et al. (1992) hanno suggerito che il mancato uso di un capezzolo nella prima lattazione tende a ridurre la sua produttività nella prima parte della lattazione successiva, ma questo aspetto non è stato mai ulteriormente approfondito fino a poco tempo fa. Infatti i risultati di uno studio appena terminato (Farmer et al., 2012), mostrano che i suinetti di una scrofa al secondo parto che poppano da un capezzolo che non è stato utilizzato durante il primo parto pesavano 1,1 kg in meno degli altri suinetti il giorno 56 dopo la nascita. Ciò è dovuto ad un aumento di peso inferiore durante l'allattamento. Anche lo

sviluppo mammario è stato influenzato negativamente al secondo parto per il mancato utilizzo di un capezzolo al primo parto. È interessante notare che i suinetti sembrerebbero in grado di differenziare un capezzolo utilizzato da uno non utilizzato alla lattazione precedente, come dimostrato da differenze nel comportamento aggressivo.

In conclusione, è evidente che più fattori in combinazione sono coinvolti nel predire la resa in produzione di latte della scrofa e con l'utilizzo che si fa ad oggi di linee genetiche iperprolifiche è diventato indispensabile fornire strategie di gestione e di alimentazione il più efficienti possibile per migliorare ancora di più le performance attese. Particolare attenzione dovrebbe essere data alla nutrizione delle scrofette da rimonta al fine di garantire il massimo sviluppo mammario e quindi il futuro potenziale di produzione di latte. L'uso di ingredienti alimentari bioattivi, come i fitoestrogeni, può rivelarsi uno strumento utile per raggiungere questo obiettivo

BIBLIOGRAFIA:

Farmer, C., Knight, C., Flint, D. 2007a. Mammary involution and endocrine status in sows: effects of weaning age and lactation heat stress. Can. J. Anim. Sci. 87: 35-43.

Farmer, C., Palin, M-F, Theil, P. K., Sorensen, M. T., Devillers, N. 2012. Milk production from a teat in second parity is influenced by whether it was suckled or not in first parity. J. Anim. Sci. Submitted.

Farmer, C., Palin, M-F. 2005. Exogenous prolactin stimulates mammary development an alters expression of prolactin-related genes in prepubertal gilts. J. Anim. Sci. 83: 825-832.

Farmer, C., Palin, M-F. 2008. Feeding flaxseed to sows during late-gestation and lactation affects mammary development but not mammary expression of selected genes in their offspring. Can. J. Anim. Sci. 88: 585-590.

Farmer, C., Palin, M-F., Gilani, G.S., Weiler, H., Vignola, M, Choudhary, R.K., Capuco, A.V. 2010. Dietary genistein stimulates mammary hyperplasia in gilts. Animal 4: 454-465.

Farmer, C., Petit, H. V., Weiler, H., Capuco, A.V. 2007b. Effects of dietary suplementation with flax during prepuberty on fatty acid profile, mammogenesis, and bone resorption in gilts. J. Anim. Sci. 85: 1675-1686.

Farmer, C., Petitclerc, D., Sørensen, M.T., Vignola, M., Dourmad, J.Y. 2004. Impacts of dietary protein level and feed restriction during prepuberty on mammogenesis in gilts. J. Anim. Sci. 82: 2343-2351.

Farmer, C., Sørensen, M.T., Petitclerc, D. 2000. Inhibition of prolactin in the last trimester of gestation decreases mammary gland development in gilts. J. Anim. Sci. 78: 1303-1309.

Ford, J.A.Jr, Kim, S.W., Rodriguez-Zas, S.L., Hurley, W.L. 2003. Quantification of mammary gland tissue size and composition changes after weaning in sows. J. Anim. Sci. 81: 2583-2589.

Fraser, D., Thompson, B.K., Rushen, J. 1992. Teat productivity in second lactation sows: influence of use or non-use of teats during the first lactation. Anim. Prod. 55: 419-424.

Head, R.H., Williams, I.H. 1991. Mammogenesis is influenced by pregnancy nutrition. In: Batterham, E.S. (Ed.), Manipulating Pig Production III. Australasian Pig Science Association, Werribee, p. 33.

Head, R.H., Williams, I.H. 1995. Potential milk production in gilts. In: Hennessy, D.P., Cranwell, P.D. (Eds.), Manipulating Pig Production V. Australasian Pig Science Association, Werribee, p. 134.

Howard, K.A., Nelson, D.A., Garcia-Sirera, J., Rozeboom, D.W. 1994. Relationship between body tissue accretion and mammary development in pregnant gilts. J. Anim. Sci. 72 (Suppl 1): 334.

Hurley, W.L., Doane, R.M., O=Day Bowman, M.B., Winn, R.J., Mojonnier, L.E., Sherwood, O.D. 1991. Effect of relaxin on mammary development in ovariectomized pregnant gilts. Endocrinology 128: 1285-1290.

Kensinger, R.S., Collier, R.J., Bazer, F.W. 1986. Effect of number of conceptuses on maternal mammary development during pregnancy in the pig. Domest. Anim. Endocrinol. 3: 237-245.

Kim, S.W., Easter, R.A., Hurley, W.L. 2001. The regression of unsuckled mammary glands during lactation in sows: the influence of lactation stage, dietary nutrients, and litter size. J. Anim. Sci. 79: 2659-2668.

Kirchgessner, V., Roth-Maier, D.A., Neumann, F.J. 1984. Zum einfluss der aufzuchtintensitat auf die spatere reproduktionsleistung von sauen (On the influence of rearing intensity on the later reproduction performance of sows). Zuchtungskunde 56: 176-188.

Kusina, J., Pettigrew, J.E., Sower, A.F., White, M.E., Crooker, B.A., Hathaway, M.R. 1999a. Effect of protein intake during gestation on mammary development of primiparous sows. J. Anim. Sci. 77: 925-930.

Kusina, J., Pettigrew, J.E., Sower, A.F., White, M.E., Crooker, B.A., Hathaway, M.R. 1999b. Effect of protein intake during gestation and lactation on the lactational performance of primiparous sows. J. Anim. Sci. 77: 931-941.

Le Cozler, Y., David, C., Beaumal, V., Hulin, J.C., Neil, M., Dourmad, J.Y. 1998. Effect of feeding level during rearing on performance of Large White gilts. Part 1: growth, reproductive performance and feed intake during the first lactation. Reprod. Nutr. Dev. 38: 363-375.

Le Cozler, Y., Ringmar-Cederberg, E., Rydhmer, L., Lundeheim, N., Dourmad, J.Y., Neil, M. 1999. Effect of feeding level during rearing and mating strategy on performance of Swedish Yorkshire sows. 2. Reproductive performance, food intake, backfat changes and culling rate during the first two parities. Anim. Sci. 68: 365-377.

McLaughlin, C. L., Byatt, J.C., Curran, D.F., Veenhuizen, J.J., McGrath, M.F., Buonomo, F.C., Hintz, R.L., Baile, C.A. 1997. Growth performance, endocrine, and metabolite responses of finishing hogs to porcine prolactin. J. Anim. Sci. 75: 959-967

Nielsen, O.L., Pedersen, A.R., Sørensen, M.T. 2001. Relationships between piglet growth rate and mammary gland size of the sow. Livest. Prod. Sci. 67: 273-279.

Pluske, J.R., Williams, I.H., Aherne, F.X. 1995. Nutrition of the neonatal pig. In: Varley, M.A. (Ed), The Neonatal Pig - Development and Survival. CAB International, Wallingford, pp. 187-235.

Sørensen, M.T., Danielsen, V., Busk, H. 1998. Different rearing intensities of gilts: I. Effects on subsequent milk yield and reproduction. Livest. Prod. Sci. 54: 159-165.

Sørensen, M.T., Farmer, C., Vestergaard, M., Purup, S., Sejrsen, K. 2006. Mammary development in prepubertal gilts fed restrictively or ad libitum in two sub-periods between weaning and puberty. Livest. Sci. 99: 249-255.

Sørensen, M.T., Sejrsen, K., Purup, S. 2002. Mammary gland development in gilts. Livest. Prod. Sci. 75: 143-148.

Theil, P.K., Labouriau, R., Sejrsen K., Thomsen, B., Sørensen, M.T. 2005. Expression of genes involved in regulation of cell turnover during milk stasis and lactation rescue in sow mammary glands. J. Anim. Sci. 83: 2349-2356.

Weldon, W.C., Thulin, A.J., MacDougald, O.A., Johnston, L.J., Miller, E.R., Tucker, H.A. 1991. Effects of increased dietary energy and protein during late gestation on mammary development in gilts. J. Anim. Sci. 69: 194-200.

TAVOLA ROTONDA
PATOLOGIA COMPORTAMENTALE

STEREOTIPIE E IL SISTEMA DI VALUTAZIONE WELFARE QUALITY® PER I SUINI

DALMAU A., VELARDE A.

IRTA. Finca Camps i Armet s/n. Monells, ES-17121. antoni.dalmau@irta.cat

Si definisce comportamento anormale una chiara deviazione dal normale comportamento espresso dalla maggioranza dei membri di una specie quando possono esprimere il loro intero repertorio di comportamenti. Comportamenti anomali comuni nei suini sono le stereotipie, mordere la coda, mordere la vulva, *belly nosing* e cannibalismo. La stereotipia è la ripetizione di una sequenza di movimenti apparentemente privi di funzione nel contesto in cui vengono espressi. La ripetizione può essere regolare o irregolare, breve o lunga. Le stereotipie più comuni riscontrate nei suini, in particolare in quelli stabulati in gabbie sono la masticazione a vuoto (il suino imita movimenti di masticazione, anche quando non c'è alcun cibo da masticare, ed è caratterizzata da masticazione, bocca aperta, e formazione di schiuma e ipersalivazione) e il mordere le sbarre (l'animale apre e chiude la bocca intorno a sbarre / tubazioni metalliche, impegnando la lingua e denti con la superficie ed eseguendo movimenti di masticazione). Anche la pressione continua e ripetuta dell'abbeveratoio da parte di alcune scrofe viene considerata una stereotipia.
Il suino ha una innata propensione ad esprimere comportamenti di esplorazione, grufolamento e masticazione in seguito a motivazioni sia di tipo esplorativo che alimentare. Quando gli individui non sono in grado di esprimere questi comportamenti in ambienti poco o scarsamente arricchiti compaiono comportamenti anomali, come una sorta di reindirizzamento del comportamento esplorativo e di ricerca del cibo. Inoltre, al fine di evitare un'eccessiva deposizione di grasso, i suini vengono spesso limitati nel loro accesso al cibo. L'alimentazione razionata, i.e. una restrizione alimentare quantitativa, ha come conseguenza un senso di fame, che va ad aumentare la motivazione alimentare e il comportamento di ricerca del cibo. Questa situazione induce comportamenti orali anomali, ed è particolarmente critica quando si verifica in ambiente poco arricchito. Pertanto, il modo migliore per ridurre le stereotipie in allevamento è quello di fornire materiali manipolabili agli animali, come la paglia, per soddisfare i bisogni esplorativi e di ridurre la fame cronica inserendo nella dieta una fonte di fibra o di nutrienti resistenti alla digestione nello stomaco.

I cittadini europei considerano lo stato di benessere degli animali da allevamento come un aspetto importante della qualità finale degli alimenti. Per questo motivo, la Commissione Europea ha adottato un Action Plan (2006-2010) sulla protezione e il benessere degli animali che ha come principali obiettivi quello di migliorare gli standard minimi per il benessere degli animali e quello di introdurre indicatori standardizzati del benessere degli animali durante tutta la vita dell'animale. Welfare Quality ® (WQ) è un progetto finanziato dall'UE progettato per integrare nelle informazioni della catena alimentare anche il benessere degli animali a livello di allevamento, affrontando sia le aspettative sociali che le richieste del mercato, e sviluppando sistemi affidabili di valutazione del benessere in allevamento. In seguito ad un accordo tra consumatori, rappresentanti dei gruppi di parti interessate, politici e comunità scientifica, il Welfare Quality ® ha stabilito quattro principi del benessere degli animali: i) buona alimentazione; ii) buona stabulazione, iii) buona salute e iv) comportamento appropriato. All'interno di questi principi, il progetto ha definito dodici criteri distinti ma complementari di benessere degli animali e per ognuno di questi criteri sono stati validati

diversi indicatori / parametri. Ove possibile, questi protocolli tengono in considerazione l'animale, piuttosto che l'ambiente nel quale viene allevato, e, così facendo, fanno meno affidamento sulle misure basate sulle risorse e la gestione, mentre puntano maggiormente agli effetti del sistema di stabulazione e di allevamento sull'animale stesso. La decisione su come scegliere misure pertinenti si è basata su dati scientifici e questa scelta è stata determinata sulla base di fattori quali la validità, la fattibilità e la ripetibilità. Ad esempio nel caso della valutazione a livello di allevamento di suini in accrescimento il protocollo è organizzato come segue: alle misure di buona alimentazione, stabulazione, e salute viene assegnato un punteggio a livello di box e individuale utilizzando una scala a 3 punti da 0 a 2. Le scale di valutazione sono state selezionate in modo tale che un punteggio pari a 0 venga assegnato quando il benessere è buono, un punteggio di 1, quando applicabile e fattibile, quando esiste qualche compromesso sul benessere, e un punteggio di 2, quando il benessere è scarso e inaccettabile. Per ciascuna misura, vengono annotati il numero di animali o box con un punteggio di 1 o 2. In alcuni casi, quando una condizione può essere solo presente o assente, viene utilizzata una scala binaria (0: assente / 2: presente). All'interno di un allevamento vengono valutati i suini di 10 box selezionati. Ai suini viene assegnato un punteggio individuale per quanto riguarda presenza di tremori, ansima/respiro affannoso, accalcamento, BCS, bursiti, imbrattamento (o la presenza di feci sul corpo), ferite sul corpo, morsicatura della coda, zoppia, respiro pesante e affannoso, deviazione del grugno, prolasso rettale, condizione della cute, e presenza di ernie. La valutazione di tremori, respiro affannato e accalcamento vengono fatte prima che l'osservatore entri nel box e osservando tutto il gruppo. L'accalcamento viene valutato solo in animali a riposo, poco prima che gli animali iniziano ad alzarsi in risposta alla presenza dell'osservatore. Tosse e starnuti vengono valutati in sei punti di osservazione diversi dell'allevamento dopo aver stabilito che tutti gli animali possono essere visti e controllati dal corridoio. Il comportamento appropriato viene valutato analizzando il comportamento sociale ed esplorativo, facendo la valutazione qualitativa del comportamento (QBA), e testando il rapporto uomo-animale (HAR). Il comportamento sociale ed esplorativo viene valutato mediante *scan sampling*. I suini vengono definiti come attivi o inattivi. I comportamenti registrati da suini attivi sono i seguenti: comportamento sociale positivo, comportamento sociale negativo, comportamento esplorativo, e altri (mangia, beve, ecc.). Il QBA viene effettuato in sei punti di osservazione per azienda per un totale di 15 minuti. Il QBA utilizza termini descrittivi con una connotazione espressiva per riflettere le esperienze degli animali ad una particolare situazione. HAR viene valutato sulla base di un test per la paura dei suini in presenza dell'uomo. Per questo test, vengono selezionati 10 box per allevamento. Ogni box viene valutato nel suo insieme e vengono considerate solo 2 possibilità: 0: nessuna risposta di panico in presenza dell'uomo, 2: il 60% degli animali nel box mostra panico in presenza dell'uomo.

CAUSE E CONTROLLO DEL *TAIL BITING* NEI SUINI

EDWARDS S.

Newcastle University, School of Development Agriculture, Food & Rural, Newcastle upon Tyne NE1 7RU,
sandra.edwards@ncl.ac.uk

Perché il *tail biting* è importante?

Il *tail biting* (morsicatura della coda) è un comportamento che si verifica in maniera imprevedibile in gruppi di suini e si è dimostrato un problema difficile da gestire nel settore suinicolo in tutto il mondo. Il termine può descrivere un comportamento nel quale il suino morde la coda, ma non provoca lesioni, ma più comunemente viene utilizzato per descrivere un problema clinico, in cui il morso è abbastanza grave da provocare sanguinamento e lesioni progressive della coda, fino a lasciare una ferita aperta. La reale portata del problema è scarsamente documentata. I dati ottenuti dal rilevamento al macello di code morsicate indicano una prevalenza dello 0,5-3,4% (EFSA 2007), ma questi valori sono sottostimati e rappresentano solo i casi più gravi. Gli studi riportano circa 3 code con lievi lesioni per ogni caso grave di *tail biting*. Inoltre, i dati ottenuti dalla sorveglianza al macello sottovalutano la portata del problema, dal momento che i suini gravemente morsi rischiano di morire o di essere sottoposti ad eutanasia già in azienda. Un focolaio di *tail biting* ha implicazioni molto gravi sia per il benessere degli animali e sia sulla redditività aziendale, a causa della mortalità o dell'eutanasia associate ai casi gravi, alle terapie fatte dal veterinario e ai costi sanitari per i casi meno gravi, alle ridotte performance dei suini interessati e di tutto il gruppo a causa dei problemi comportamentali, e al danneggiamento della carcassa causato da infezioni secondarie. Nei focolai più gravi, l'effetto sul costo di produzione può superare i 20 € per ogni suino nel lotto interessato. A causa di tali conseguenze, la maggior parte delle aziende scelgono il taglio della coda dei suinetti giovani per ridurre il rischio. Nonostante la provata efficacia nel ridurre il rischio di *tail biting*, l'alta prevalenza di taglio della coda nell'Unione Europea (> 90%; EFSA, 2007) viene messa in discussione dalle associazioni animaliste e di benessere animale, dal momento che sembra ignorare le direttive in vigore dal 1991 (direttiva 91/630) che specificano che il taglio della coda non deve essere effettuato di routine.

Cause di *tail biting*

Tutti i giudizi in materia di *tail biting* evidenziano la complessità del problema e la natura multifattoriale delle circostanze predisponenti (es. EFSA, 2007;. Taylor et al, 2010). Il fattore di rischio più significativo si riferisce alla mancanza di un adeguato arricchimento ambientale, con conseguente riorientamento degli comportamento esplorativo dei suini nei confronti dei compagni di box che può portare al verificarsi del *tail biting*. Una seconda categoria di fattori di rischio è correlata alle carenze alimentari, tra le quali carenze di proteine e di aminoacidi essenziali, l'inadeguato apporto di minerali (soprattutto sale) e calorico, con conseguente aumento della motivazione di ricerca del cibo e fornendo ancora una volta le circostanze per reindirizzare il comportamento esplorativo. Una terza categoria di fattori di rischio è legato alla carenza di una progettazione specifica dell'area del box, in particolare in relazione alla superficie disponibile (alta densità di animali), allo spazio di alimentazione o alla disponibilità di abbeveratoi. Questi fattori generano situazioni in cui aumenta la concorrenza, e suini meno dominanti possono arrivare a

mordere la coda, nel tentativo di spiazzare gli altri animali dalla risorsa di cui hanno bisogno. Una quarta categoria di fattori di rischio si riferisce all'inadeguatezza climatica all'interno della stalla, in particolare a calore o freddo eccessivi, alla presenza di una velocità dell'aria troppo elevata all'interno del box e ad una scarsa qualità dell'aria, in termini di presenza di polveri o gas nocivi. L'ultima categoria di rischio, molto importante, è lo stato sanitario del suino in generale; allevamenti con uno stato sanitario scarso, o che hanno subito da poco problemi sanitari, hanno solitamente una prevalenza maggiore di *tail biting*.
Dal momento che i suini morsi alla cada sono subito visibili e facili da identificare, sono stati il fulcro della maggior parte degli studi e sono molti i dati che documentano le loro caratteristiche. Tuttavia risulta più importante analizzare le caratteristiche dei suini "morsicatori". Gli studi suggeriscono che potrebbero esistere differenze di razza e una componente genetica nella predisposizione al *tail biting*. E' stato anche riportato frequentemente in forma di aneddoto che siano gli "scartini" i responsabili dei focolai di *tail biting*, cosa che potrebbe suggerire qualche deficienza metabolica che li rende più propensi a masticare e mordere la coda. Tuttavia, non tutti gli studi sono coerenti nel descrivere le caratteristiche dei suini che mordono la coda. Queste incoerenze possono essere spiegate dalla recente teoria di Taylor et al. (2010), secondo la quale il *tail biting* potrebbe derivare da diversi stati motivazionali. Hanno infatti suggerito l'esistenza di tre diversi tipi di *tail biting*, basati sulle osservazioni della situazione nella quale si verifica il comportamento e il modo in cui viene effettuato. Il primo tipo è un *tail biting* cosiddetto a "due stadi", in cui inizialmente il masticare la coda è delicato e non provoca lesioni, ma poi diventa più forte e crea lesioni e sanguinamento della coda dei feriti, che porta ad un'intensificazione del comportamento all'interno del gruppo. Questo tipo di *tail biting* si pensa derivi dalla frustrazione della motivazione di ricerca del cibo, quando l'arricchimento ambientale presente nel box è insufficiente a soddisfare i comportamenti associati alla motivazione alimentare ed esplorativi indotti dallo stato metabolico dei suini. Un tipo di *tail biting* molto diverso, definito "improvviso-violento", si verifica quando una coda viene improvvisamente afferrata e morsa con forza senza alcuna manipolazione precedente, causando spesso gravi lesioni immediate. Questo comportamento è stato spesso rilevato in suini in competizione per le risorse, quali gli alimentatori o gli spazi preferiti all'interno del box e può derivare da frustrazione o aggressività. Il terzo tipo di *tail biting*, indicato come "ossessivo", è caratterizzato da individui chiaramente identificabili che cercano con insistenza le code e le mordono con forza per lunghi periodi di tempo, in un modo tale che sembra indicare la presenza di una patologia comportamentale.

Controllo del *tail biting*

Un modo per ridurre la prevalenza del *tail biting* in campo è quello di sviluppare approcci specifici aziendali per la riduzione del rischio. Taylor et al. (2012) hanno sviluppato un foglio di calcolo denominato Husbandry Advisory Tool (HAT) per la prevenzione del *tail biting*, che comprende domande su 83 fattori di rischio. Questi fattori di rischio sono ponderati in base al loro relativo impatto sul *tail biting* in base alle informazioni presenti nella letteratura scientifica o ottenute dalla consultazione di esperti al fine di assegnare un punteggio di rischio. Uno studio inglese ha mostrato che lo score di rischio ottenuto mediante HAT rappresentava un predittore altamente significativo del verificarsi di *tail biting* in ogni box di aziende differenti, suggerendo il potenziale di l'utilizzo di questo approccio per motivare il miglioramento a livello di allevamento.
Il *tail biting* è più facile da controllare se l'intervento avviene in una fase iniziale. Recenti studi hanno quindi cercato di individuare i segnali predittivi, che potrebbero dare la possibilità di intervenire con cambiamenti quali aumento dell'arricchimento ambientale, trasferimento

in un nuovo box o cambiamenti nella dieta, prima che si verifichi un focolaio clinico. Il modo in cui i suini con coda non amputata portano la coda può predire il tail biting clinico 2-3 giorni in anticipo, insieme ad altri segni comportamentali, tra i quali un aumento delle manipolazioni non-dannose della coda e un aumento dell'irrequietezza nel gruppo. Cercare di controllare un focolaio, una volta stabilito, è molto impegnativo. Le misure che possono essere efficaci comprendono l'allontanamento del suino che morde, lo spostamento di tutti i suini sanguinanti e la fornitura regolare di materiale di arricchimento ambientale. L'efficacia di unguenti repellenti, come il Stockholm tar o altre preparazioni commerciali, l'apporto di sale o l'uso di integratori alimentari appositamente progettati, è ancora incerta.

CONCLUSIONI

Il *tail biting* rimane un problema di difficile gestione per il settore suinicolo, perché, nonostante l'aumento delle conoscenze scientifiche, i fattori multifattoriali predisponenti sono ancora molto diffusi nella pratica commerciale. Le strategie che prevedono la selezione genetica, un'adeguata gestione sanitaria ed il miglioramento delle pratiche di arricchimento ambientale appaiono tutte come possibili fattori chiave per il controllo di questo problema.

BIBLIOGRAFIA

EFSA. 2007. Scientific report on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems. The EFSA Journal, 611: 1-98.

Taylor, N.R., Main, D.C.J., Mendl, M., Edwards, S.A. 2010. Tail-biting A new perspective. Vet. J. 186: 137-147.

Taylor, N.R., Parker, R.M.A., Mendl, M., Edwards, S.A , Main, D.C.J. 2012. Prevalence of tail biting risk factors on commercial farms in relation to intervention strategies. Vet. J. in press. (see also http://www.vetschool.bris.ac.uk/webhat/ for details)

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

UNA SOSTANZA PERMEABILIZZANTE PER AUMENTARE L'EFFICACIA DEGLI ACIDI ORGANICI ED ALDEIDE CINNAMICA

A PERMEABILISING SUBSTANCE TO INHANCES THE EFFICACY OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMALDEHYDE

RIEMENSPERGER A.V., PAODAN D., PASTEINER S.

Biomin Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg - Austria

Parole chiave: sostanza permeabilizzante, acidi organici, aldeide cinnamica, inibizione batterica.
Key words: permeabilising substance, organic acids, cinnamaldehyde, bacteria inhibition.

Riassunto

E' stata condotta una prova in vitro per dimostrare gli effetti di una sostanza permeabilizzante (SP) sull'efficacia di una miscela antimicrobica (MA) contenente un mix di acidi organici (acido formico, propionico ed acetico) ed aldeide cinnamica (AC). Per l'esperimento sono state testate la MA sola ed in combinazione con la SP in una piastra per microtitolazione sull'inibizione di Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E.coli O55:K59(B5):H ed E.coli O128:H2. La MA ha inibito la crescita di Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E.coli O55:K59(B5):H ed E.coli O128:H2 del 6,9; 3,9; 29,5 e 2,3% ripettivamente mentre l'aggiunta del SP alla MA ha dato come risultato l'inibizione di crescita del 86,2; 100,0; 70,5 e 100,0%. In una prova in vivo sono stati usati 60 suini svezzati di 8,72 ± 1,15 Kg peso vivo a 28 giorni di età per verificare se l'aggiunta di MA e SP ad una dieta standard (mangime starter: 13,70 MJ/Kg energia metabolizzabile (ME), 12,27% proteina greggia (PG) e e 1,37% Lisina (Lis) da 0 a 14 giorni, mangime grower: 12,47 MJ/Kg ME, 17,96% PG e 1,14% Lis da 15 a 56 giorni) migliora i risultati di accrescimento in un periodo di 56 giorni. Il peso finale (37,7 vs. 35,5) e l'accrescimento medio giornaliero (517 g vs. 481 g) sono stati significativamente ($p<0,05$) aumentati in suini alimentati con la dieta sperimentale in confronto ai suini alimentati con la dieta di controllo. In conclusione, l'addizione di SP ad una MA ha inibito la crescita batterica più efficacemente. Alimentare con una MA e SP suinetti in svezzamento ha dato come risultato aumentato accrescimento giornaliero ed un peso finale più alto.

Abstract

An in vitro trial was conducted in order to show the effects of a permeabilising substance (PS) on the efficacy of an antimicrobial mixture (AM) containing a blend of organic acids (formic, propionic and acetic acid) and cinnamaldehyde. For the experiment the AM alone and in combination with the PS were tested in a micorplate assay on the inhibition of Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E. coli O55:K59(B5):H and E. coli O128:H2. The AM inhibited the growth of Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E. coli O55:K59 (B5):H and E. coli O128:H2 by 6.9, 3.9, 29.5 and 2.3%, while the addition of the PS to the AM resulted in a growth inhibition of 86.2, 100.0, 70.5 and 100.0%. In an in vivo trial 60 pigs weaned with 8.72 ± 1.15 kg live weight at 28 days of age were used to investigate, if the addition of an AM and PS to a standard diet (starter diet: 13.70 MJ/kg metabolisable energy (ME), 17.27% crude protein (CP) and 1.37% Lysine (Lys) from day 0 to 14, grower diet: 12.47 MJ/kg ME, 17.96% CP and

1.14% Lys from day 15 to 56) improves growth performance over a 56 day period. Final body weight (37.7 vs. 35.5kg) and average daily gain (517 g vs. 481 g) were significantly ($p<0.05$) improved in pigs fed the experimental diet compared to pigs fed the control diet. In conclusion, adding a PS to an AM inhibited bacterial growth more effectively. Feeding an AM and PS to weaning pigs resulted in improved ADG and a higher final weight.

INTRODUZIONE

Gli antibiotici promotori di crescita (AGPs) sono stati usati per decenni nella produzione animale poichè era già stato dimostrato nei primi anni '50 the gli AGPs incrementano l'efficienza produttiva (Moore et al., 1946, Jukes et al., 1950). Comunque, non molto più tardi sono stati pubblicati i primi rapporti di resistenza negli animali destinati all'alimentazione umana (Starr e Reynolds, 1951; Barnes, 1958; Elliot e Narnes, 1959) e si sollevarono le prime preoccupazioni sullo sviluppo della antibiotico resistenza nei batteri patogeni umani (Swann, 1969). Al giorno d'oggi é provato il traferimento di geni di resistenza agli antibiotici dagli animali all'uomo (Greko, 2001). Ciò ha portato al bando di antibiotici promotori di crescita nella produzione animale all'interno dell'Unione Europea nel 2006.

Comunque, poichè la presenza di batteri ha un costo é necessario combattere la sfida batterica. In relazione al tratto gastrointestinale (GI) i batteri competono con l'organismo ospite per il nutrimento, possono secernere composti tossici e dare inizio alla risposta immunitaria, dare reazioni infiammatorie. Non solo la competizione per i nutrienti e la perdita di energia netta a favore della microflora intestinale porta alla riduzione dei risultati di crescita (Dibner e Richards, 2005), ma anche la alterazione di appetito e metabolismo durante le infezioni causate da batteri patogeni danno come risultato di perdita di peso e ridotto incremento (Beisel, 1988). Poichè gli acidi organici mostrano effetti antimicrobici sono stati posti al centro dell'attenzione per rimpiazzare gli AGPs (Vondruskova et al., 2010).

E' stato dimostrato che gli acidi organici hanno effetti antimocrobici (Freitag,2007). Inoltre, l'aldeide cinnamica (AC) é un fitochimico (Michiels et al., 2007) che é stato dimostrato avere effetti antimicrobici, poichè ha come bersaglio la proteina FtsZ, che gioca un ruolo importante nella divisione batterica dei germi patogeni. La aldeide cinnamica si lega alla FtsZ, inibisce la sua riunione e scombussola la formazione dell'anello Z inibendo così il processo di divisione batterica (Domadia et al., 2007). Per cui non é sorprendente che la ricerca ha dimostrato un forte effetto antimicrobico dell'aldeide cinnamica a bassi livelli di concentrazione (Michielis et al, 2007).

Inoltre, benchè siano noti sostituti naturali per gli AGPs, é ancora una grossa sfida combattere i batteri Gram negativi. I Gram negativi hanno una membrana cellulare esterna addizionale, una barriera, che impedisce che composti tossici entrino nella cellula e possano distruggere le funzioni vitali (Cánovas et al., 2005). Questa membrana esterna può essere perturbata da sostanze permeabilizzanti (SP) che rendono la cellula batterica più suscettibile a composti tossici (Alakomi,2001; Vaara, 1992).

L'ipotesi degli studi correnti era (1) poichè le SP indeboliscono la membrana esterna dei batteri Gram negativi rendendoli più suscettibili a sostanze che sono capaci di distruggere le funzioni cellulari vitali, gli effetti di una combinazione di acidi organici (AB) e AC potrebbero essere potenziati poichè molto probabilmente possono penetrare più facilmente all'interno della membrana batterica. Inoltre, se (2) gli effetti di inibizione dei batteri da parte di una combinazione di acidi organici, AC e SP possono essere riscon-

trati in vitro, ciò può anche essere riscontrato in vivo dando aumento dei risultati di crescita quando la carica batterica entro il tratto gastrointestinale (GI) è diminuita e l'ospite non deve competere con i batteri per il nutrimento ad un tasso elevato nonché minor risposta immune dovuta alla presenza di batteri patogeni, che ha effetto negativo sui risultati di crescita.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati in vitro tramite una piastra di microtitolazione gli effetti sull'inibizione di crescita dei batteri patogeni di una miscela antimicrobica (MA) consistente di una miscela di acidi (AB: acido formico, propionico ed acetico) e aldeide cinnamica (AC) sola ed in combinazione con una sostanza permeabilizzante (SP. Biotronic® Top3, Biomin Holding GmbH, Austria). I patogeni testati sono stati Salmonella enteritidis (DSM 9898), Salmonella typhimurium (DSM 554), E. coli O55:K59(B5):H (DSM 4779) and E. coli O128:H2 (DSM 8703). Il substrato Brodo Trypticase Soja (TSB, Oxoid) é stato preparato seguendo le istruzioni del produttore. Poi, il substarto é stato autoclavato a 121°C per 15 minuti per assicurare la sterilità. Ogni ceppo é stato coltivato da una crio-cultura usando 100 ìl di sospensione batterica decongelata e 100 ml di substrato ed incubando per tutta la notte a 37°C. Il giorno dopo, la cultura principale è stata creata usando 100 µl della cultura incubata la notte e 100 ml di substrato. La cultura principale è stata incubata di nuovo per 4 ore assicurarando completa vitalità. E' stata misurata la densità ottica (DO) della cultura principale a 690 nm usando un fotometro con lampada a tungsteno. Per la piastra di microtitolazione, le culture principali sono state diluite finché non hanno mostrato una DO di 0,1 ± 0,015, e poi aggiunte alla piastra di microtitolazione. Le due culture di Salmonella sono state diluite 1:10 e le due di E.coli 1:15, rispettivamente. I pozzetti delle piastre di microtitolazione sono stati riempiti fino a 200 µl, usando perciò 100 µl di sospensione batterica diluita della cultura principale eccetto che per il controllo del substrato. La MA da sola e la combinazione con la SP è stata testata miscelando 100 µl della soluzione di lavoro con la sospensione batterica nei pozzetti della piastra di microtitolazione, risultando come concentrazione finale di 0,15% AB, 8,5 ppm AC e 0,034% SP nel substarto. Le piastre sono state incubate a 37°C. La DO ottica dei pozzetti delle piastre è stat misurata sia prima che dopo 24 ore di incubazione ad una lunghezza d'onda di 620 nm con un lettore di piastre. La variazione di densità ottica nei pozzetti del test sono stati confrontati con la variazione nei pozzetti il controllo di crescita. Ogni verifica delle piatre di microtitolazione è stata eseguita tre volte con quattro pozzetti per ogni sostanza testata, fornendo dodici dati per ceppo e verifica e le verifiche ed i valori dati nei risultati sono i valori medi di questi dodici dati per ogni ceppo.

L'esperimento in vivo è stato condotto per verificare gli effetti di una AB, AC ed una SP sulle prestazioni di crescita di suini allo svezzamento. I suini sono stati svezzati a 8,72 ± 1,15 Kg di peso vivo a 28 ± 2 giorni di età. In totale, sono stati usati 60 suini divisi in 6 gruppi (sessi misti) di 10 suinetti per gruppo e allevati per 56 giorni.

I suinetti sono stati assegnati col sistema random a due trattamenti con tre box di replicazione sulla base del peso corporeo. I suini erano su pavimento parzialmente grigliato e cemento con misure dei box 2,30 x 1,50 m (spazio per suino 0,35 m2), provvisti di abbeveratoi per garantire assunzione ad libitum di acqua ed un sistema di alimentazione computerizzato (Spotmix, Schauer, Austria). I suini erano alimentati una volta al giorno alle h. 09,00. Sono stae fornite due diverse diete in sequenza durante la prova, con la dieta 1 alimentati dallo svezzamento fino al giorno 14 e la dieta 2 dal giorno 15 post-svezzamento fino alla fine della prova 56 giorno dopo lo svezzamento. La dieta starter è stata formulata per contenere 13,70

MJ/Kg di energia metabolizzabile (ME), 17,27% di proteina greggia (PG) e 1,37% Lisina (Lys). La dieta grower era formulata per contenere 12,47 MJ/Kg ME, 17,96% PG e 1,14% Lys (Tav. 1). Tutte le diete soddisfacevano o eccedevano le necessità nutrizionali secondo le raccomadazioni del NRC (1998).

Tabella Ingredienti e composizione chimica delle diete sperimentali (g/kg)

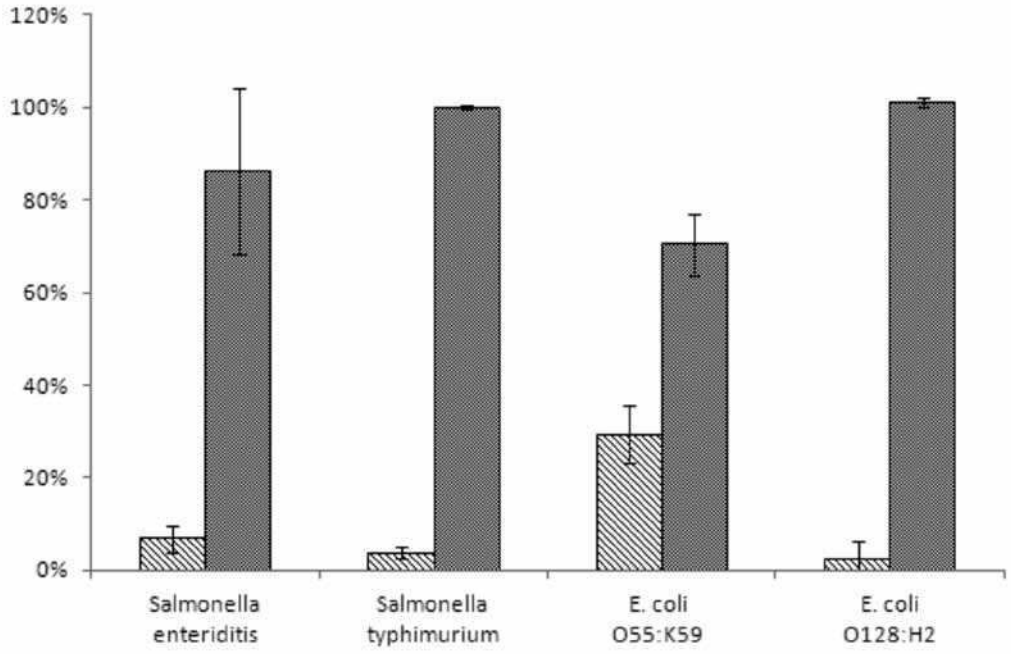
	Dieta Starter	Dieta Grower
Orzo	400	140
Frumento	100	358
Mais	220	-
Insilato integrale di mais	-	250
Soja Hi-Pro	-	190
Soya full fat	82.4	-
Proteina di patata	62.0	-
Destrosio	33.3	-
Lattosio	24.9	-
Siero di latte polvere	24.9	-
Semi di zucca	23.4	-
Fosfato monocalcico	11.7	9.0
Ca da rocce calc.	9.3	13.0
Sale	4.5	4.0
Olio di semi di colza	2.8	3.0
Magnesio fosfato	0.8	2.0
Radichette di malto d'orzo	-	30
Melasso di polpa di bietola da zuc.	-	1.0
Composizione chimica		
Sostanza secca	880	880
Proteina greggia	171	188
Lisina	13.5	12.0
Energia digeribile (MJ ME/kg)	13.5	13.0

Ogni suino è stato pesato singolarmente allo svezzamento, a 14 giorni, al giorno 42 ed alla fine della prova a 56 giorni. Il consumo di mangime è stato registrato settimanalmente, ed è stata calcolata la conversione (ICA).
Il singolo box è stato considerato come l'unità sperimentale nell'analisi delle variabili. I risultati di prestazione sono stati analizzati tramite analisi di varianza (ANOVA) usando SPSS 15.0. Il modello includeva l'effetto del trattamento su accrescimento medio giornaliero (AMG), assunzione di cibo, ICA e peso finale. Il peso iniziale è stato usato come covariante. I dati sono stati analizzati per il periodo da 0 a 14 giorni post svezzamento, da 15 a 56 giorni port svezzamento e per i due periodi combinati. I dati sono espressi come "least square mean" (LSM, algoritmo del gradiente stocastico) ± errore standard (e.s.), ed il test dell'ordine multiplo di Duncan è stato usato per separare le difference di LSM . Gli effetti sono stati considerati come significanti se $P<0.05$.

RISULTATI

La miscela di MA e AC combinate ha inibito la crescita di Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E. coli O55:K59 (B5):H and E. coli O128:H2 del 6,9; 3,9; 29,5 e 2,3% rispettivamente. L'addizione della SP alla miscela antimicrobica ha dato come risultato una inibizione di crescita di Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E. coli O55:K59 (B5):H and E. coli O128:H2 del 86,2; 100,0; 70,5 e 100,0 % ripettivamente.

Figura 1: inibizione di Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, E. coli O55:K59 (B5):H and E. coli O128:H2 da una (▨) miscela di acido formico, propionico ed acetico combinati con aldeide cinnamica (miscela antimicrobica) e (■) la miscela antimicrobica combinata con la sostanza permeabilizzante.



Come si vede nella Tav. 2, peso al giorno 42 ($p<0.01$) e peso finale ($p<0.05$) erano significativamente più alti nei suini alimentati con la dieta sperimentale in confronto ai suini alimentati con la dieta di controllo, dieta senza additivi aggiunti (25,7 vs. 27,24 e 35,5 vs. 37,7, ripettivamente).

Per il periodo intero, l'AMG era aumentato significativamente ($p<0.05$) nel gruppo sperimentale in confronto al gruppo di controllo (517 vs. 481 g/d).

Tavola 2: Effetti della somministrazione di una miscela di acidi organici, aldeide cinnamica ed una sostanza permeabilizzante su sviluppo del peso e risultato di crescita di suini in svezzamento (least square mean, e.s.)

		Controllo gruppo	Sperimentale gruppo	e.s.	Sig.†
Sviluppo del peso	Peso iniziale	8.71	8.76	0.12	
	Peso giorno 14	10.81	11.10	0.16	
	Peso giorno 42	25.68	27.24	0.35	*
	Peso finale	35.54	37.71	0.42	**
Risultati giorno 0 a 14	Incr. Medio/die(g/die)	156	174	7.01	
	Consumo (g/die)	292	284	13.6	
	Conversione	1.87	1.63	0.06	
Risultati giorno 15 a 42	Incr. medio/die (g/die)	535	573	9.67	
	Consumo (g/day)	1 028	1 054	36.7	
	Conversione	1.93	1.87	0.05	
Risultati giorno 43 a 56	Incr. medio/die (g/die)	842	878	12.9	
	Consumo (g/die)	1 650	1 671	58.8	
	Conversione	1.95	1.93	0.01	
Risultati totali (giorno 0 a 56)	Incr. medio/die (g/die)	483	516	6.7	*
	Consumo (g/day)	976	1 028	32.0	
	Conversione	2.04	1.99	0.05	

† Sig. = Significatività; *p<0.05; **p<0.01

DISCUSSIONE

Gli acidi organici sono ben noti per l'effetto di incremento dell'accrescimento e di modulazione della flora microbica intestinale nei suini (PIVA et al., 2002). Inizialmente la supplementazione con acidi organici nella dieta dei suini aveva come target lo svezzamento, ma ci sono prove che l'acidificazione è benefica anche per suini in stadi più avanzati della crescita in termini di incremento della digestibilità ileale apparente di proteine e aminoacidi e aumento dell'assorbimento dei minerali (Mroz et al., 1997; Jongbloed e Jongbloed, 1996). Comunque, specialmente in suini allo svezzamento l'uso di acidi organici è benefico poiché riducono il pH che ha as sua volta un effetto benefico sulla produzione di enzimi e che è insufficiente nei suinetti appena svezzati (Freitag, 2007). E' dimostrato in letteratura che usando miscele invece di singoli acidi é più benefico come risultato di uno spettro di attività più ampio (Namkung et al.,2003). Inoltre, è stato stato ipotizzato che anche combinando acidi organici con olii essenziali può essere benefico grazie ai loro effetti in differenti parti del tratto gastroenterico. Gli acidi organic eserciterebbero la loro attività nel mangime e alto intestino e gli olii essenziali più nella parte distale del tratto intestinale (Langhout,2000). Perciò effetti benefici deriverebbero da effetti sui batteri e potrebbero essere visti su un vasto tratto del tubo gastroenterico. I fitochimici come l'AC sono definiti sostanze chimiche caratterizzate come molecole organiche trovate ed isolate da diversi prodotti derivati dalle piante, come gli olii essenziali (de Souza et al., 2005) a maggior ragione si dovrebbe aspettare effetto combinando acidi organici e AC.

Inoltre Kwon et al. (2003) hanno trovato una forte inibizione sulla separazione cellulare. Il meccanismo che sta dietro l'inibizione della separazione cellulare è stato descritto in dettaglio da Domadia et al. (2007). La separazione cellulare dei batteri viene regolata dalla FtsZ, una proteina che si raccoglie nell'anello Z nella zona di divisione cellulare. La AC lega FtsZ, perturba la formazione citocinetica dell'anello Z ed inibisce le sue dinamiche di assemblaggio. Questo meccanismo porta in generale ad una riduzione di carica batterica.
E' noto che la SP indebolisce la membrana esterna dei germi Gram negativi. Questo rende i batteri più suscettibili agli antimicrobici idrofobici. Il modo d'azione della SP che riguarda il danneggiamento della membrana esterna dei batteri Gram negativi viene descitto in dettaglio da Alakomi (2001). Comunque, si può presupporre che se i batteri gram negativi sono più suscettibili agli antimicrobici idrofoboci quando la loro membrana esterna è danneggiata da una SP, potrebbe essere possible aumentare anche l'effetto antimicrobico di acidi organici miscelati (MA) e AC. Ciò può essere concluso a seguito della prova in vitro nella quale si è testato l'inibizione dibatteri della MA consistente della AB combinata con AC e la MA in aggiunta alla SP, così come l'effetto inibitorio della MA sui batteri testati è stata aumentata quando si è aggiunta SP.
Comunque deve essere considerato che, specialmente attorno allo svezzamento, i suini hanno un basso stato immunitario poiché l'immunità passiva acquisita dal colostro materno non viene più fornita e l'immunità attiva comincia solo a svilupparsi (Gaskin and Kelley, 1995). Ciò rende il suinetto estremamante vulnerabile conto i batteri patogeni. Il calo repentino dei lattobacilli causati dal drastico cambio di dieta priva il suinetto di buona parte del benefico effetto competitivo. Anche in altri stadi della crescita comunque la sfida batterica deve essere fronteggiata. Accade che come da un lato la flora microbica intestinale entro il tratto GI procura reale beneficio all'ospite come nutrizione e protezione procurando prodotti della fermentazione e la prevenzione della colonizzazione da parte dei patogeni. Dall'altra parte la microflora (1) compete con l'animale ospite per i nutrienti, (2) produce come cataboliti aminoacidi tossici, (3) diminuisce la digeribilità dei grassi, (4) stimola il ricambio veloce delle cellule epiteliali di assorbimento, (5) richiede un aggiunta di secrezione di muco dalle cellule mucipare caliciformi , e (6) stimola lo sviluppo del sistema immunitario e della risposta infiammatoria (Dibner e Richers, 2005). Tutto questo può condurre a diminuita capacità di crescita. Si può perciò presupporre che la combinazione di acidi organici con AC ed un SP potrebbe essere benefica in vivo poiché i batteri possono essere combattuti più efficacemente. Così un miglioramento del risultato di crescita del suino alimentato AB, AC e SP può essere atteso, poiché sono disponibili più nutrienti per l'ospite e meno energia viene persa a favore della microflora. Questo viene anche mostrato nei risultati della prova descritta.
Nel periodo totale il consumo di mangime non ha mostrato differenze significative tra gruppo di controllo e quello sperimentale. Ma l'AMG è stato significativamente più alto nel gruppo sperimentale ($p<0.05$). In generale si sa che il suino mangia per soddisfare il fabbisogno di energia (Nam e Aherne, 1994) Il fatto che con uguale consumo di mangime si è ottenuto un più alto AMG porta alla conclusione che più nutrienti erano disponibili per l'ospite a seguito di ridotto carico batterico, con risultato di aumentato incremento di peso.
Conclusioni
In conclusione, i risultati della prova in vitro indicano che l'effetto degli acidi organici e AC sulla inibizione dei batteri può essere significativamente incrementato dall'inclusione di SP. Nella prova in vivo supportata dall'ipotesi che alimentando un AB, AC ed una SP aumenta il risultato di crescita. Non si può concludere se l'inclusione di SP può ulteriormente incrementare l'effetto di acidi organici e AC in vivo, poiché il gruppo di controllo era un gruppo negativo senza additivi aggiunti alla dieta. Perciò ulteriori prove devono essere eseguite per

provare se l'aggiunta di una SP alla MA può aumentare il loro effetto sui risultati zootecnici. E' stato presupposto che il miglioramento nel risultato di crescita deriva da una riduzione del carico batterico entro il tratto GI. Questo può solo essere ipotetizzato, poiché anche per comprovare questa ipotesi e necessaria ulteriore ricerca.

BIBLIOGRAFIA

Alakomi H.-L. (2001) "Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane". PhD, Helsinki Univ.

Barnes E.M. (1958) "The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry". Brit Vet J. 114, 333-344.

Beisel W.R. (1988) "The effects of infections on growth" in: Steffens G.L., Rumsey T.S. "Biomechanisms regulating growth and development" Kulwer, Boston, 395-408.

Cánovas,M., Torroglosa T., Iborra J.L. (2005) "Permeabilization of Escherichia coli cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine". Enzyme Microb Tech. 37, 300-308.

de Souza E.L., de Oliveira Lima E., de Luna Freire K.R., Paiva de Sousa C. (2005) "Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods". Braz Arch Biol Techn. 48, 245-250.

Dibner J.J., Richards J.D. (2005) "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action". Poultry Sci. 84, 634-643.

Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. (2007) "Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde". Biochem Pharmacol. 74, 831-840.

Elliot S.D., Barnes E.M. (1959) "Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline". J Gen Microbiol. 20, 426-433.

Freitag M. (2007) "Organic acid and salts promote performance and health in animal husbandry" in: Lückstädt C. "Acidifiers in animal nutrition" Nottingham University Press, Nottingham, 1-11.

Gaskins H.R., Kelley K.W. (1995) "Immunology and neonatal mortality" in: Varley M.A. "The neonatal pig: development and survival" CAB International, Wallingford, Oxon, 39-55.

Greko C. (2001) "Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters" in Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. "Gut environment of pigs" Nottingham University Press, Nottingham 219-230.

Jongbloed A.W., Jongbloed R. (1996) "The effect of organic acids in diets for growing pigs on enhancement of microbial phytase efficacy". ID-DLO Report no. 96009. Lelystad, The Netherlands: Institute for Animal Science and Health

Jukes T.H., Stokstad E.L.R., Taylor R.R., Combs T.J., Edwards H.M., Meadows G.B. (1950) "Growth promoting effect of aureomycin on pigs". Arch Biochem. 26, 324-330.

Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. (2003) "Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on Bacillus cereus". Lett Appl Microbiol. 37, 61-65.

Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S., Dierick N. (2007) "In vitro dose-repsonse of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora". Livest Sci. 109, 157-160.

Moore P.R., Evenson A., Luckey T.D., McCoy E., Elvehjem E.A., Hart E.B. (1946) "Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick". J Biol Chem. 165, 437-441.

Mroz Z., Jongbloed A.W., Partanen K., van Diepen J.T.M., Kemme P.A., Kogut J. (1997) "Apparent digestibility of amino acids and balance of nitrogen and minerals as influenced by

buffering capacity and organic acids in diets for growing swine". J Anim Sci. 75, (Suppl. 1), 185 (Abstr.).
Nam D.S., Aherne F.X. (1994) "The effects of lysine: energy ratio on the performance of weanling pigs". J Anim Sci. 72, 1247-1256.
Namkung H., Li M., Yu H., Cottrill M., Gong J., deLange C.F.M. (2003) "Impact of feeding blends of organic acid or herbal extracts on growth performance, gut microflora and digestive function in newly weaned pigs". in: Ball, R. (ed.) "Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, Alberta, Canada, 14-17 May" University of Alberta, Department of Agriculture, Food, and Nutritional Science, Alberta, Canada 93-95
National research council (NRC) 1998. Nutrient requirements of swine (10th ed.), National Academy Press, Washington D.C.
Piva A., Casadei G., Biagi G. (2002) "An organic acid blend can moderate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis". Can J Anim Sci. 82, 527-537.
Starr M.P., Reynolds D.M. (1951) "Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin". in: "Proceedings of the 51st General Meeting of the Society of American Bacteriology, Chicago, IL, USA, 27-31 May" Society of American Bacteriologists, 15-34.
Swann M.M. (1969). Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO, London.
Vaara M. (1992) "Agents that increase the permeability of the outer membrane". Microbiol Rev. 56, 395-411.
Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I. (2010) "Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review". Vet Med Czech. 55, 199-224.

VALUTAZIONE DELLE LESIONI PODALI DI SCROFE A SEGUITO DI VARIAZIONI DIETETICHE MEDIANTE UNA INDAGINE CLINICA DI CAMPO

EVALUTATION OF SOW CLAW LESIONS BEFORE AND AFTER DIET CHANGE THROUGH A FIELD CLINICAL INVESTIGATION

CALISESI L.[1], PERSONA P.[2]

[1] Gruppo Amadori, San Vittore di Cesena (FC), [2] Fatro S.p.A, Ozzano Emilia (BO)

Parole chiave: Minerali forma organica, Lesioni podali, Clinica di campo
Key words: Organic minerals, Claw lesions, Field clinic.

Riassunto. E' stata condotta una prova di campo con lo scopo di valutare se la variazione qualitativa della dieta di un gruppo di scrofe caratterizzata dalla sostituzione parziale di Zn, Cu, Mn e Fe in forma inorganica con pari quantità di minerali in forma organica determinava variazioni qualitative e quantitative delle lesioni podali presenti su queste. Sono state coinvolte nella prova circa 4500 scrofe distribuite in tre allevamenti situati tra le province di Ferrara e Forlì-Cesena.
Gli animali sono stati valutati prima della modifica alimentare (+0) e dopo 6 (+6) e 12 mesi (+12) dalla variazione attraverso una indagine di campo che ha consentito di valutare la percentuale di animali affetti da lesioni podali e di determinare la gravità delle alterazioni rilevate.
Questo lavoro ha consentito di raccogliere un'importante mole di dati dai quali si deduce che la modifica della razione alimentare sopra descritta ha determinato una diminuzione dell'incidenza e della gravità delle lesioni podali sulle scrofe oggetto della prova già a partire dalla valutazione +6. Tale risultato è stato confermato ed in parte migliorato attraverso la valutazione +12.

Abstract. A field trial has been conducted with the purpose to appraise if a diet qualitative change (partial replacement of inorganic Zn, Cu, Mn and Fe with equal amounts of organic form) of a group of sows determined changes in claw lesions. During the test were involved 4500 sows of three farms located between provinces of Ferrara and Forlì-Cesena.
Sows have been checked before diet change (+0) and after 6 (+6) and 12 months (+12) through field trial and percentage of animals with claw lesions and severity of these has been recorded.
From the data obtained we can conclude that a significant decrease of incidence and severity of claw lesions after 6 months the diet change. This result is confirmed and partly improved in the +12 check.

INTRODUZIONE

Le patologie podali rappresentano un problema emergente nella moderna suinicoltura caratterizzato da gravi ripercussioni negative sul benessere degli animali e conseguentemente sul management e sulla economicità dell'allevamento [Allerson *et al.*, 2008]. Secondo studi recenti il 97% delle scrofe che mostrano alterazioni locomotorie presentano lesioni podali più o meno gravi e ben il 47% delle scrofe vengono riformate a seguito di zoppia andando a costituire la seconda causa di riforma involontaria "obbligatoria" nella scrofa dopo le alterazioni riproduttive [Anil *et al.*, 2009] [Bradley *et al.*, 2008].
I fattori che determinano la comparsa di tali lesioni sono molteplici. Deve essere sicuramente presa in considerazione la componente genetica ma rivestono un ruolo di fondamentale importanze anche l'ambiente di allevamento, il management e le caratteristiche qualitative e quantitative della

dieta [Amstel *et al.*, 2009] [Zoric *et al.*, 2008].
Scopo di questo lavoro è stato di valutare qualitativamente e quantitativamente le lesioni podali presenti sulle scrofe di tre siti 1 prima e dopo la variazione qualitativa della dieta di queste caratterizzata dalla sostituzione parziale di Zn, Cu, Mn e Fe in forma inorganica con pari quantità di minerali in forma organica.

MATERIALI E METODI

Gli animali oggetto della ricerca provengono da tre scrofaie (siti 1), denominate in questo articolo COD, SM1 e SM2 composte da circa 1500 scrofe ciascuna, a rimonta esterna e situate tra le province di Ferrara e Forlì-Cesena. Tali siti produttivi appartengono alla medesima filiera e sono caratterizzati dalla presenza di un'unica genetica animale a dalla stessa gestione del piano alimentare sia in termini qualitativi che quantitativi. I tre allevamenti possono anche essere valutati come similari prendendo come riferimento lo stato sanitario essendo positivi alle medesime patologie e non essendosi verificati, nel corso della prova, episodi rilevanti da un punto di vista patologico.
Per ogni allevamento è entrato a fare parte della prova un gruppo di circa 150 scrofe rappresentative dello stesso; cioè il 10% circa della popolazione costituente il sito produttivo. Tali soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico con lo scopo di valutare e quantificare le lesioni podali mediante il modello proposto da Deen J. [Deen *et al.*, 2008]. Tale modello prevede la differenziazione di 7 lesioni podali che sono ritenute le più frequenti cause di zoppia nella scrofa [Anil *et al.*, 2005]:

- Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare.
- Separazione suola-tallone.
- Fessurazione della linea bianca.
- Frattura orizzontale della parete.
- Frattura verticale della parete.
- Crescita eccessiva o difforme degli unghioni.
- Lesione agli unghielli accessori.

Ogni tipologia di lesione è stata catalogata attribuendone un punteggio tanto più alto quanto più la lesione è stata ritenuta grave (tabella numero 1). In questa maniera si è costituito un *lesion score* delle varie lesioni che sono state riscontrate.

Tabella 1: parametri esaminati e *lesion score* attribuito.
Table 1*: parameters and lesion scoring.*

	Gravità lesione e punteggio lesion score			
	Assente	*Lieve*	*Moderata*	*Grave*
	0	*1*	*2*	*3*
Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare	*Nessuna lesione*	*Lieve ipercheratosi e/o leggera erosione del tessuto molle del tallone*	*Numerose screpolature con evidente ipercheratosi ed erosione*	*Grave ipercheratosi ed erosione con screpolature diffuse*
Separazione suola-tallone	*Nessuna lesione*	*Lieve separazione della giuntura*	*Estesa separazione nella giuntura*	*Estesa e profonda separazione nella giuntura*
Fessurazione della linea bianca	*Nessuna lesione*	*Breve e/o superficiale separazione lungo la linea bianca*	*Estesa separazione lungo la linea bianca*	*Estesa e profonda separazione lungo la linea bianca*
Frattura orizzontale della parete	*Nessuna lesione*	*Evidente emorragia, frattura orizzontale limitata o superficiale nella parete dell'unghiello*	*Frattura orizzontale estesa ma poco profonda nella parete dell'unghiello*	*Fratture orizzontali multiple o profonde nella parete dell'unghiello*
Frattura verticale della parete	*Nessuna lesione*	*Frattura verticale limitata o superficiale nella parete dell'unghiello*	*Frattura verticale estesa ma poco profonda nella parete dell'unghiello*	*Fratture verticali multiple o profonde nella parete dell'unghiello*
Crescita eccessiva o difforme degli unghioni	*Nessuna lesione*	*Uno o più unghioni leggermente più lunghi del normale*	*Uno o più unghioni significativamente più lunghi del normale*	*Unghielli molto lunghi compromettono l'andatura dell'animale*
Lesione agli unghielli accessori	*Nessuna lesione*	*Leggermente più lunghi del normale*	*Unghiello allungato sulla superficie del pavimento quando l'animale è in stazione*	*Unghiello torto, parzialmente o completamente scomparso*

Per rendere l'esecuzione del *lesion score* podale più rapida possibile si è scelto di eseguire la valutazione clinica unicamente sui piedi degli arti posteriori nel momento in cui le scrofe si trovavano in sala parto in quanto è stato ritenuto più facile accedere ad una visuale ottimale delle estremità distali del treno posteriore visto che gli animali tendono a porsi coricati su di un fianco per diverse ore al giorno e visto che il corridoio di passaggio del personale è situato posteriormente a questi.
E' stato eseguito il primo lesion score su ciascuno dei tre allevamenti (+0) facenti parte la prova con lo scopo di valutare e quantificare le lesioni podali in ciascuno di questi.
Dopo questa prima valutazione è stato modificato da un punto di vista qualitativo il piano alimentare degli animali sostituendo, per kg di mangime, 50 mg di Zn, 20 mg di Cu, 20 mg di Mn e 10 mg di Fe in forma inorganica con pari quantità di minerali in forma organica (Availa Sow e Availa Fe da Zinpro Performance Mineral).
Sono state quindi eseguite altre due valutazioni su ciascun allevamento a distanza di 6 mesi (+6) e di 12 mesi (+12) dalla modifica del piano alimentare.

RISULTATI

I risultati raccolti nel corso della prova sono riassunti di seguito.
Nella seguente tabella (numero 2) sono esposti i dati raccolti dall'osservazione clinica effettuata presso l'allevamento COD al momento della prima valutazione (COD+0) ed a seguito delle due successive valutazioni effettuate dopo 6 mesi (COD+6) e 12 mesi (COD+12) la variazione del piano alimentare. I dati sono stati raccolti determinando la percentuale di animali per ognuna delle 7 lesioni podali che compongono il modello applicato.

Tabella 2: percentuale soggetti con alterazioni podali allevamento COD.
Table 2*: percentage of animals with claw lesions in COD farm.*

	Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare				Separazione suola-tallone				Fessurazione della linea bianca				Frattura orizzontale della parete				Frattura verticale della parete				Crescita eccessiva o difforme degli unghioni				Lesione agli unghielli accessori			
	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra
COD+0	16,5%	28,3%	39,5%	15,3%	94,4%	3,2%	1,8%	0,6%	95,2%	0,6%	4,0%	0,2%	96,0%	0,8%	1,6%	1,6%	92,7%	0,9%	4,0%	2,4%	96,8%	2,2%	0,2%	0,8%	86,8%	5,0%	5,5%	2,7%
COD+6	57,3%	27,6%	13,5%	1,6%	99,0%	0,2%	0,8%	0,0%	98,4%	0,9%	0,7%	0,0%	99,5%	0,5%	0,0%	0,0%	99,0%	1,0%	0,0%	0,0%	96,9%	2,2%	0,9%	0,0%	91,1%	4,2%	0,5%	4,2%
COD+12	52,0%	40,0%	5,5%	2,5%	97,0%	2,5%	0,5%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	99,0%	0,8%	0,2%	0,0%	96,5%	3,5%	0,0%	0,0%	98,5%	1,5%	0,0%	0,0%	98,0%	0,0%	1,0%	1,0%

Nella tabella 3 sono esposti i dati raccolti presso l'allevamento SM1.

Tabella 3: percentuale soggetti con alterazioni podali allevamento SM1.
Table 3*: percentage of animals with claw lesions in SM1 farm.*

	Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare				Separazione suola-tallone				Fessurazione della linea bianca				Frattura orizzontale della parete				Frattura verticale della parete				Crescita eccessiva o difforme degli unghioni				Lesione agli unghielli accessori			
	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra
SM1+0	4,2%	6,0%	54,2%	35,6%	89,8%	1,8%	6,0%	2,4%	89,2%	3,0%	5,4%	2,4%	94,0%	3,0%	3,0%	0,0%	98,8%	0,6%	0,6%	0,0%	89,3%	2,4%	5,3%	3,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
SM1+6	24,7%	49,5%	22,7%	3,1%	97,9%	1,9%	0,2%	0,0%	99,5%	0,3%	0,2%	0,0%	93,8%	3,6%	2,1%	0,5%	96,9%	3,1%	0,0%	0,0%	97,9%	0,9%	0,7%	0,5%	95,4%	2,6%	1,5%	0,5%
SM1+12	58,8%	35,6%	5,6%	0,0%	98,1%	1,3%	0,6%	0,0%	98,8%	1,2%	0,0%	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	0,0%	98,1%	1,9%	0,0%	0,0%	98,8%	0,0%	0,6%	0,6%	98,8%	0,6%	0,6%	0,0%

Nella seguente tabella (numero 4) sono esposti i dati relativi al terzo allevamento oggetto della prova (SM2).

Tabella 4: percentuale soggetti con alterazioni podali allevamento SM2.
Table 4*: percentage of animals with claw lesions in SM2 farm.*

	Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare				Separazione suola-tallone				Fessurazione della linea bianca				Frattura orizzontale della parete				Frattura verticale della parete				Crescita eccessiva o difforme degli unghioni				Lesione agli unghielli accessori			
	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra
SM2+0	17,5%	21,3%	35,6%	25,6%	78,8%	6,3%	12,5%	2,4%	89,4%	3,1%	5,0%	2,5%	92,5%	2,1%	3,1%	1,2%	96,3%	1,3%	0,9%	1,5%	93,8%	3,1%	3,1%	0,0%	95,9%	1,5%	0,7%	0,9%
SM2+6	34,5%	35,5%	24,5%	5,5%	99,1%	0,9%	0,0%	0,0%	96,4%	0,9%	1,7%	1,0%	91,8%	7,3%	0,9%	0,0%	90,9%	6,4%	2,7%	0,0%	97,3%	2,7%	0,0%	0,0%	98,2%	0,9%	0,9%	0,0%
SM2+12	53,4%	34,1%	8,5%	4,0%	94,9%	1,7%	2,3%	1,1%	96,0%	2,3%	1,7%	0,0%	97,7%	1,1%	1,1%	0,1%	99,4%	0,6%	0,0%	0,0%	99,4%	0,3%	0,3%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Tramite i dati rilevati esposti nelle tabelle 2, 3 e 4 si è potuto creare la tabella numero 5 in cui è indicato il *lesion score* relativo ad ogni tipologia di lesione podale ricavato moltiplicando ciascuna percentuale di lesione per il relativo punteggio di gravità assegnato.

Tabella 5: punteggio lesioni podali allevamento COD, SM1 e SM2.
Table 5*: claw lesion scoring in COD, SM1 and SM2 farms.*

		Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare				Separazione suola-tallone				Fessurazione della linea Bianca				Frattura orizzontale della parete,				Fratturas verticale della parete				Crescita eccessiva o difforme degli unghioni				Lesione agli unghielli accessori			
		Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra	Ass	Lie	Mod	Gra
COD	+0	0,0	28,3	79,0	45,9	0,0	3,2	3,6	1,8	0,0	0,6	8,0	0,6	0,0	0,8	3,2	4,8	0,0	0,9	8,0	7,2	0,0	2,2	0,4	2,4	0,0	5,0	11,0	8,1
	+6	0,0	27,6	27,0	4,8	0,0	0,2	1,6	0,0	0,0	0,9	1,4	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	2,2	1,8	0,0	0,0	4,2	1,0	12,6
	+12	0,0	40,0	11,0	7,5	0,0	2,5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,4	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0
SM1	+0	0,0	6,0	108,4	106,8	0,0	1,8	12,0	7,2	0,0	3,0	10,8	7,2	0,0	3,0	6,0	0,0	0,0	0,6	1,2	0,0	0,0	2,4	10,6	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	+6	0,0	40,5	45,4	9,3	0,0	1,9	0,4	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0	0,0	3,6	4,2	1,5	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0	0,9	1,4	1,5	0,0	2,6	3,0	1,5
	+12	0,0	35,6	11,2	0,0	0,0	1,3	1,2	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	1,8	0,0	0,6	1,2	0,0
SM2	+0	0,0	21,3	71,2	76,8	0,0	6,3	25,0	7,2	0,0	3,1	10,0	7,5	0,0	3,1	6,2	3,6	0,0	1,3	1,8	4,5	0,0	3,1	6,2	0,0	0,0	1,5	1,4	2,7
	+6	0,0	35,5	49,0	16,5	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,9	3,4	3,0	0,0	7,3	1,8	0,0	0,0	6,4	5,4	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,9	1,8	0,0
	+12	0,0	34,1	17,0	12,0	0,0	1,7	4,6	3,3	0,0	2,3	3,4	0,0	0,0	1,1	2,2	0,3	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Nella tabella 6 sono riassunti i dati relativi alla tabella 5 determinando il *lesion score* totale e medio per ogni tipologia di lesione.

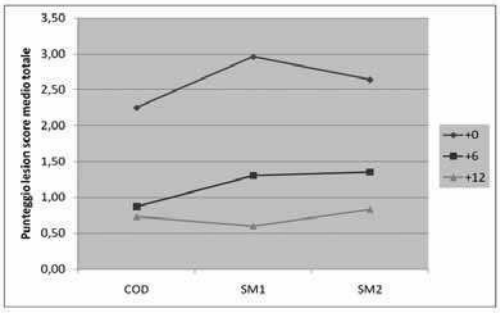
Tabella 6: riepilogo tabella numero 5.
Table 6*: summary table number 5.*

		Ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare		Separazione suola-tallone		Fessurazione della linea Bianca		Frattura orizzontale della parete		Frattura verticale della parete		Crescita eccessiva o difforme degli unghioni		Lesione agli unghielli accessori		Totale	
		Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med	Tot	Med
COD	+0	153,20	1,53	8,60	0,09	9,20	0,09	8,80	0,09	16,10	0,16	5,00	0,05	24,10	0,24	225,00	2,25
	+6	59,40	0,59	1,80	0,02	2,30	0,02	0,50	0,01	1,00	0,01	4,00	0,04	17,80	0,18	86,80	0,87
	+12	58,50	0,59	3,50	0,04	0,00	0,00	1,20	0,01	3,50	0,04	1,50	0,02	5,00	0,05	73,20	0,73
SM1	+0	221,20	2,21	21,00	0,21	21,00	0,21	9,00	0,09	1,80	0,02	22,00	0,22	0,00	0,00	296,00	2,96
	+6	104,20	1,04	2,30	0,02	0,70	0,01	9,30	0,09	3,10	0,03	3,80	0,04	7,10	0,07	130,50	1,31
	+12	46,80	0,47	2,50	0,03	1,20	0,01	2,50	0,03	1,90	0,02	3,00	0,03	1,80	0,02	59,70	0,60
SM2	+0	169,30	1,69	38,50	0,39	20,60	0,21	12,90	0,13	7,60	0,08	9,30	0,09	5,60	0,06	263,80	2,64
	+6	101,00	1,01	0,90	0,01	7,30	0,07	9,10	0,09	11,80	0,12	2,70	0,03	2,70	0,03	135,50	1,36
	+12	63,10	0,63	9,60	0,10	5,70	0,06	3,60	0,04	0,60	0,01	0,90	0,01	0,00	0,00	83,50	0,84

DISCUSSIONE

Nel grafico numero 1 è rappresentato l'andamento del punteggio medio di *lesion score* ottenuto da ciascun gruppo al momento della prima valutazione (+0) e nelle due successive valutazioni effettuate dopo la modifica dietetica (+6 e +12).

Grafico 1: punteggio medio lesioni podali valutazioni +0, +6 e +12.
Graph 1*: average claw lesion score +0, +6 and +12 controls.*



Appare evidente come l'andamento del punteggio medio di *lesion score* ottenuto dai gruppi COD, SM1 e SM2 al momento della prima valutazione si discosti rispetto alle due successive valutazioni. Comparando tramite test di t-student l'andamento della valutazione +0 rispetto alle altre due si ottiene un valore di p (livello di significatività) di 0,0051 tra gruppo +0 e +6 e di 0,0009 tra gruppo +0 e +12. Vi è quindi una differenza statisticamente significativa tra il gruppo +0 e gli altri due gruppi. Non vi è invece differenza statisticamente significativa tra gruppo +6 e +12 (p=0,0553).

Prendendo come riferimento il *lesion score* specifico della lesione podale "fessurazione della linea bianca" si può determinare che la percentuale di soggetti privi di lesioni si discosta in maniera statisticamente significativa mettendo a confronto il gruppo +0 con il gruppo +6 (p=0,0344) e +12 (p=0,0381) (vedi grafico numero 5). Tale differenza si conferma anche prendendo in considerazione la gravità delle lesioni rilevate. Non è stata evidenziata invece nessuna differenza tra il gruppo +6 e +12.

Grafico 2: punteggio medio lesione "ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare".
Graph 2*: average score heel overgrowth and erosion lesion.*

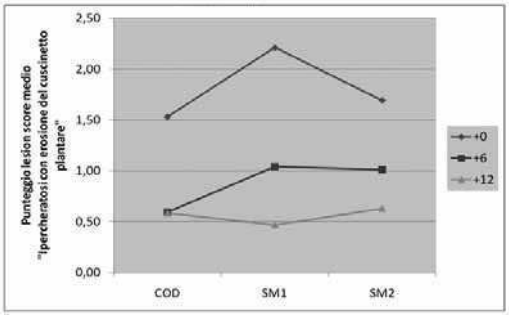


Grafico 3: riepilogo punteggio medio lesione "fessurazione della linea bianca".
Graph 3: *average score white line lesion.*

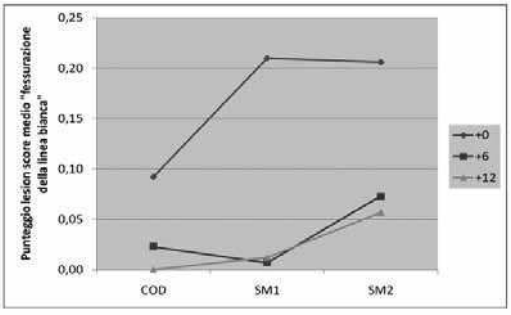


Grafico 4: percentuale soggetti con lesione podale "ipercheratosi ed erosione del cuscinetto plantare" allevamenti COD, SM1 e SM2.
Graph 4*: percentage of animals with heel overgrowth and erosion lesion in COD, SM1 and SM2 farms.*

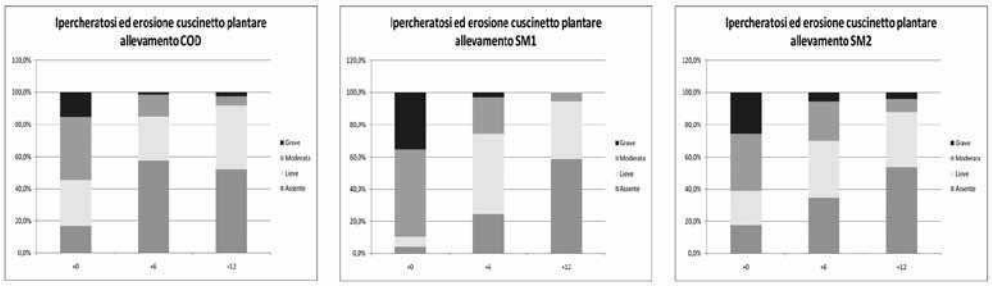


Grafico 5: percentuale soggetti con lesione podale "fessurazione della linea bianca" allevamenti COD, SM1 e SM2.
Graph 5*: percentage of animals with white line lesion in COD, SM1 and SM2 farms.*

CONCLUSIONI

L'utilizzo del *lesion score* e della percentuale di soggetti affetti da alterazioni patologiche su gruppi di animali rappresentativi della popolazione rappresentano uno strumento molto interessante per la valutazione qualitativa e quantitativa delle lesioni podali.

Dall'analisi dei dati raccolti si può dedurre che la variazione qualitativa dietetica delle scrofe presenti nei tre allevamenti oggetto della prova, caratterizzata dalla sostituzione parziale di Zn, Cu, Mn e Fe in forma inorganica con pari quantità di minerali in forma organica, ha determinato una diminuzione dell'incidenza e della gravità delle lesioni podali .

Tale diminuzione si è resa evidente già alla prima valutazione di controllo (+6) eseguita dopo 6 mesi dalla variazione delle dieta. In particolare è stata evidenziata una diminuzione statisticamente significativa della gravità delle lesioni riconducibili ad ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare. E' stata anche dimostrata una riduzione delle alterazioni riguardanti la fessurazione della linea bianca in termini di diminuzione della gravità delle lesioni dei soggetti colpiti ed anche come aumento della percentuale di soggetti privi di questo tipo di alterazione.

La valutazione eseguita dopo 12 mesi dalla modifica alimentare (+12) ha confermato ed in parte migliorato le evidenze emerse dopo la valutazione +6. E' stato infatti evidenziato, a riguardo del *lesion score* riguardante l'ipercheratosi con erosione del cuscinetto plantare, un aumento statisticamente significativo dei soggetti privi di questo tipo di lesione.

BIBLIOGRAFIA

- Allerson M., Deen J., Ward L. (2008). If sow were cows. American Association Of Swine Veterinarians, 2008: 177-180.
- Amstel S., Herd., Ward., Wilson M.E. (2009). Sow claw horn mineral concentration. American Association Of Swine Veterinarians, 2009: 409-410.
- Anil S.S., Anil L., Deen J. (2005). Evalutation of patterns of removal and associations among culling because of lameness and sow productivity traits in swine breeding herds. J Am Vet Med Assoc 2005 Mar 15; 226 (6): 956-61.
- Anil S.S., Anil L., Deen J. (2009). Effect of lameness on sow longevity. J Am Vet Med Assoc 2009 Sep 15; 235 (6): 734-8.
- Bradley C.L., Frank J.W., Maxwell C.V., Johnson Z.B., Ward T.L. (2008). Frequency and severity of claw lesion over time in the University of Arkansas sow herd. American Association Of Swine Veterinarians, 2008: 333-339.
- Deen J. and Winders M. (2008). Development of a claw lesion scoring guide for swine. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 2008: 579.
- Zoric M., Mattsson S., Kjellerby P., Wallgren P. (2008). Incidence of lameness and abrasion in piglets in identical farrowing pens with four different types of floors. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 2008: 566.

STUDIO PRELIMINARE SULL'UTILIZZAZIONE DELLA CAFFEINA NELLE SCROFE AL PARTO

PRELIMINARY STUDY ON THE USE OF CAFFEINE IN FARROWING SOWS

MAZZONI C. [1], SABBIONI A. [2], BERTINI E. [3], MENOZZI A. [3], PIANCASTELLI C.[1]., CATELLI E. [1], ZANARDELLI P. [2], ZAMBINI E.M. [2], SALERI R. [2], SUPERCHI P. [2]

[1] Veterinario libero professionista. SUIVET - Reggio Emilia; [2] Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi di Parma; [3] Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma

Parole chiave: suini, parto, caffeina
Key Words: pigs, farrowing, caffeine

Riassunto. Con l'obiettivo di migliorare la vitalità dei suinetti alla nascita, attraverso interventi di facile applicazione pratica, si è voluto verificare se la caffeina, somministrata oralmente alla scrofa, sia rilevabile nei liquidi biologici (sangue, colostro) della stessa e nel sangue dei suinetti alla nascita. A tale scopo, 6 scrofe pluripare di genetica commerciale ibrida olandese, hanno ricevuto il giorno prima del parto (gruppo 1D), nei due giorni prima del parto (gruppo 2D) o nei tre giorni prima del parto (gruppo 3D), 6 grammi/capo/giorno di caffeina, in un'unica somministrazione prima del pasto del mattino. La caffeina è stata rilevata, al momento del parto, nel sangue materno, nel sangue dei suinetti e nel colostro.

Abstract. With the aim to improve the vitality of piglets at birth, by means of an easy practical application, it was investigated whether caffeine orally administered to sows can be detected in biological fluids (blood, colostrum) of sow and in the blood of piglets at birth. For this study, 6 multiparous hybrid breeding sows received the day before delivery (group 1D), two days before delivery (group 2D) or three days before delivery (group 3D), 6 grams / head / day of caffeine, a single dose before the morning meal. Caffeine was detected at the time of delivery, in the maternal blood, in piglets blood and in colostrum.

INTRODUZIONE

La caffeina (1,3,7-trimetilxantina), una delle sostanze psicoattive più conosciute ed utilizzate al mondo, è un analettico respiratorio in grado di stimolare il centro del respiro midollare, aumentando la sensibilità al diossido di carbonio, ed è in grado di indurre broncodilatazione e di migliorare la contrattilità dei muscoli diaframmatici (Orozco-Gregorio et al., 2011). I suoi effetti sono essenzialmente dovuti alle sue azioni di antagonista dei recettori adenosinici, per cui mentre l'adenosina riduce l'eccitabilità cellulare (Fredholm, 1980), la caffeina potenzia invece l'attività di neurotrasmettitori eccitatori (Carter et al., 1995).

Dal punto di vista farmacocinetico gli studi sinora condotti, per lo più nella specie umana, hanno messo in luce che la caffeina è rapidamente e completamente assorbita nello stomaco (Magkos e Kavouras, 2005) e, a motivo della sua liposolubilità, è in grado di attraversare le membrane cellulari e di distribuirsi in tutti i liquidi biologici ed i tessuti (Carrillo e Benitez, 2000); è stato accertato il suo passaggio per diffusione passiva attraverso la placenta (Mose et al., 2008; Adén, 2011) e, dopo somministrazione orale, si rinviene nel latte materno (Stavchansky et al.,

1988). La caffeina è metabolizzata a livello epatico mediante reazioni di demetilazione con formazione di mono e dimetilxantine tra le quali figurano principalmente la paraxantina, la teofillina e la teobromina (Harland, 2000).
La caffeina viene comunemente usata, nella specie umana, nell'ipossia che affligge i neonati prematuri e quelli sottopeso (Schmidt, 2005**;** Orozco et al., 2011). La riduzione del flusso ematico e di ossigeno al feto durante il processo del parto è un'evenienza assai nota anche nella specie suina dove la mortalità perinatale dei suinetti rimane tuttora un serio problema. Circa il 40% delle morti presvezzamento, che avvengono per lo più alla nascita o durante il primo giorno di vita del suinetto, possono essere associate infatti ad una condizione di ipossia al parto (Mota et al., 2005). Una scarsa vitalità alla nascita è associata inoltre ad un prolungamento del tempo necessario al suinetto per raggiungere per la prima volta il capezzolo materno e, conseguentemente, per assumere il colostro.
I protocolli terapeutici sinora adottati per superare le difficoltà respiratorie che si hanno in un suinetto disvitale sono risultati inefficaci o di difficile applicazione pratica. Recentemente, Orozco et al. (2010) hanno osservato che la somministrazione, subito dopo la nascita, di capsule di gelatina contenenti caffeina a suinetti in condizioni di ipossia è in grado di migliorare nell'arco delle prime 24 ore alcuni parametri metabolici (glucosio, colesterolo, trigliceridi) e di normalizzare la lattacidemia ed il pH ematico. Sebbene tali risultati siano interessanti, il protocollo è indubbiamente di non facile attuazione in allevamento. Per tale motivo, abbiamo programmato una serie di esperimenti con l'intento di valutare i possibili effetti analettici della caffeina sulla vitalità dei suinetti attraverso la somministrazione del farmaco alla scrofa, operazione sicuramente più semplice. Scopo del presente lavoro è stato verificare se la caffeina somministrata oralmente nella scrofa, sia rilevabile nei liquidi biologici (sangue, colostro) e se, attraversando la barriera placentare, sia presente alla nascita nel sangue dei suinetti.

MATERIALI E METODI

Per la prova sono state utilizzate 6 scrofe pluripare (n. parto 3.2±0.97) di genetica commerciale ibrida olandese suddivise in tre gruppi di due soggetti ciascuno (1-3D). Gli animali, allevati nella stessa sala parto, hanno ricevuto 6 grammi/capo/giorno di caffeina (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Mo), miscelata a circa 200 g di mangime da lattazione, in un'unica somministrazione, prima del pasto del mattino. Il gruppo 1D ha ricevuto la caffeina il giorno prima del parto, il gruppo 2D nei due giorni prima del parto e il gruppo 3D nei tre giorni precedenti il parto. La dose di caffeina somministrata è stata uguale a quella utilizzata da Li e Hacher (1995), in uno studio effettuato per valutare gli effetti della somministrazione cronica di caffeina sullo sviluppo della ghiandola mammaria nella scrofa. Il parto è avvenuto per tutte le scrofe al 114° d di gestazione ed è stato indotto (Kirkwood et al., 1998): al 113° giorno di gestazione sono state effettuate due somministrazioni di Alfaprostol (Gabbrostim ®, Ceva Vetem SpA), alla dose di 1 mg/cadauna (split dose), alle ore 8:00 *a.m*. e 14:00 *p.m.*, nella zona perianale (ad ore 4 e ore 8 rispetto all'ano), come indicato da Kirkwood et al. (1996). Per aumentare l'effetto di sincronizzazione (protocollo ad alta sincronizzazione), la mattina del parto previsto (114° giorno), sono state somministrate alle scrofe che non avevano ancora iniziato a partorire, 14 U.I. di ossitocina (Izossitocina®, IZO SpA), nella zona perianale (Raffi et al., 2011). Al momento del parto, sono stati prelevati campioni sangue dalla vena auricolare e di colostro da tutti i capezzoli funzionanti di una linea mammaria. I campioni di sangue di tre suinetti per scrofa sono stati invece raccolti direttamente dal cordone ombelicale al momento della nascita oppure dalla vena giugulare, prima dell'assunzione di colostro. Il sangue, raccolto in provette da 2,5 ml contenenti litio-eparina, è stato immediatamente centrifugato a 1800x*g* per 10 min. (Ultra-8 Centrifuge, InfraTec, Ferrara, Italia). I camiponi di plasma e di colostro sono stati quindi conservati a -20°C

fino al momento delle analisi. I livelli di caffeina sono stati misurati mediante tecnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con rilevatore UV/VIS (Perkin-Elmer, Inc. San Jose, California, USA), sulla base della metodica di O'Connell e Zurzola (1984).
I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza ad una via (fattore fisso: gruppo), con software SPSS (ver. 19). Si è inoltre applicata l'analisi della correlazione di Pearson fra le concentrazioni di caffeina nel sangue delle scrofe e quelle nel sangue dei suinetti o nel colostro.

RISULTATI

Tutte le scrofe hanno assunto senza difficoltà la quantità di caffeina stabilita. I livelli più bassi di caffeina ($P<0.05$), come riportato nella tabella 1, sono stati rilevati nel plasma dei soggetti, scrofe e suinetti, appartenenti al gruppo 1D. Nessuna differenza significativa ($P>0,05$) si è invece riscontrata tra i soggetti appartenenti ai gruppi 2D e 3D. La concentrazione di caffeina non è risultata diversa ($P>0.05$) nel colostro dei tre gruppi.

Tabella 1 Contenuto di caffeina (µg/ml) nel plasma delle scrofe e dei suinetti e nel colostro (media ±d.s.)

Table 1 Caffeine content (µg/ml) in plasma of sows and piglets and in colostrum (mean ± s.d.).

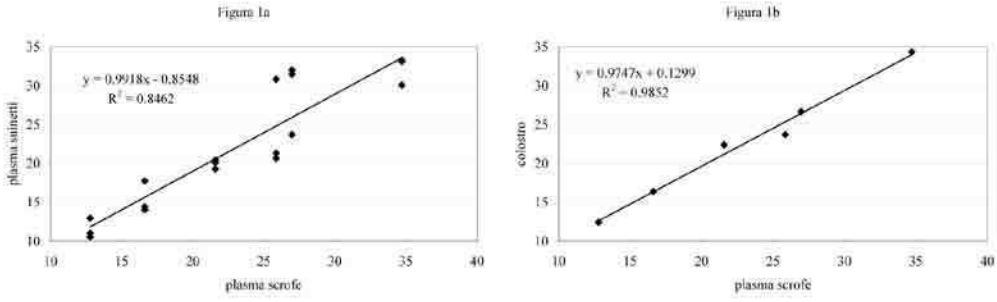
Gruppo	Plasma		Colostro
	scrofe	suinetti	
3D	25.47b± 9.09	23.77b ± 9.33	25.36± 10.35
2D	27.40b ± 2.26	26.66b ± 5.33	25.16 ± 1.71
1D	17.18a ± 5.08	15.71a ± 4.70	17.39 ± 5.75

a,b: $P<0.05$

Le concentrazioni di caffeina nel plasma materno sono risultate altamente correlate a quelle presenti nel plasma dei suinetti ($r=0.920$; $P<0.0001$) e nel colostro ($r=0.993$; $P<0.0001$) (Figura 1).

Figura 1 Relazione tra tenore di caffeina (µg/ml) nel plasma materno e: a) nel plasma dei suinetti; b) nel colostro.

Figure 1 Relationship between the caffeine content (µg/ml) in plasma of sows and: a) in plasma of piglets; b) in colostrum.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Pur tenendo conto del ridotto numero di soggetti coinvolti nello studio, i risultati ottenuti ci permettono di trarre alcune interessanti considerazioni. In primo luogo è possibile osservare che, analogamente a quanto riportato nella specie umana (Carrillo e Benitez, 2000), la caffeina, somministrata una volta al giorno alle scrofe per via orale, diffonde nei liquidi biologici. La sua presenza nel plasma di suinetti che non hanno ancora assunto il colostro ci permette inoltre di affermare che la caffeina è in grado di attraversare la barriera placentare. Alla luce dei confortanti risultati ottenuti in questa fase preliminare dello studio, le nostre indagini proseguiranno con l'intento, da un lato, di approfondire gli aspetti farmacocinetici della caffeina nella specie suina e, dall'altro, di verificare se essa è in grado di migliorare la vitalità dei suinetti alla nascita.

BIBLIOGRAFIA

Adén U. (2011) "Methylxanthines during pregnancy and early postnatal life". Handb. Exp. Pharmacol., 200, 373-389.

Carrillo J.A., Benitez J. (2000) "Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications". Clin. Pharmacokinet., 39,127-153.

Carter A.J., O'Connor W.T., Carter M.J., Ungerstedt U. (1995) "Caffeine enhances acetylcholine release in the hippocampus in vivo by a selective interaction with adenosine A1 receptors". J Pharmacol Exp Ther., 273,637-642.

Fredholm B.B. (1980) "Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine?" Trends. Pharmacol. Sci., 1, 129-132.

Harland B.F. (2000) "Caffeine and nutrition". Nutrition, 16, 522-526.

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

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

Li S., Hacker R.R. (1995) "The effect of caffeine on mammary gland development and milk yield in primiparous sows" J. Anim. Sci., 73, 534-540.

Magkos F., Kavouras S.A. (2005) "Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action". Critical Rev. Food Nutr., 45, 535-562.

Mose T., Kjaerstad M.B., Nielsen J.B., Edelfors S., Knudsen L.E. (2008) "Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system". J Toxicol Environ Health A., 71, 984-991.

Mota R.D., Martinéz-Burnes J., Trujillo O.M.E., López M.A., Rosales T.A.M., Ramírez N.R., Orozco G.H., Merino P.A., Alonso S.M. (2005) "Uterine and fetal asphyxia monitoring in parturient sows treated with oxytocin". Anim. Reprod. Sci., 86, 131-141.

O'Connell S.E., Zurzola F.J. (1984) "Rapid quantitative liquid chromatographic determination of caffeine levels in plasma after oral dosing". J. Pharm. Sci., 73, 1009-1011.

Orozco G.H., Mota R.D., Bonilla J.H., Trujillo O.M.E., Becerril H.M., Hérnadez G.R., Villanueva G.D. (2010) "Effects of administration of caffeine on metabolic variables in neonatal pigs with peripartum asphyxia". Am. J. Vet. Res., 71, 1214-1219.

Orozco G.H., Mota R.D., Villanueva G.D., Bonilla J.H., Suarez B.X., Torres G.L., Bolaños D., Hérnadez G.R., Martinez R.R., Trujillo O.M.E. (2011) "Caffeine therapy for apnea of prematurity: pharmacological treatment". Af. J. Pharm. Pharmacol., 5, 564-571.

Raffi V., Donna R., Mazzoni C., Tonon F., Borri E., Scollo A., Bonilauri P., Gherpelli M. (2011) “Induzione del parto nella scrofa con protocollo farmacologico “ad alta sincronizzazione”, Atti del XXXVII meeting annuale SIPAS, Piacenza 24-25 marzo, 157-163.
Schmidt B. (2005) “Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international caffeine for apnea of prematurity (CAP) trial”. Biol. Neonate, 88, 208-213.
Stavchansky S., Combs A., Sagraves R., Delgado M., Joshi A. (1988) “Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers”. Biopharm Drug Dispos., 9, 285-299.

RISORSE WEB GRATUITE PER IL SWINE ENTHUSIAST

FREE WEB RESOURCES FOR THE SWINE ENTHUSIAST

BARICCO G.[1], MASSA M.[2]

Medico Veterinario Libero Professionista, Torino. giuseppe@baricco.it
Medico Veterinario Libero Professionista, San Maurizio C.se (TO). manussa@libero.it

PAROLE CHIAVE: internet, informazioni, suino
KEYWORDS: internet, information, swine

***Riassunto*:** Vengono presentati alcuni siti internet destinati all'appassionato del suino, sia in lingua italiana che in lingua inglese. Per ognuno si indicano le caratteristiche fondamentali e quelli che appaiono agli Autori come gli elementi più positivi e quelli negativi. Si ribadisce che il web è una fonte quasi inesauribile di informazioni, e che una delle maggiori difficoltà per il navigatore consiste nello sviluppo di una adeguata capacità di filtro selettivo rispetto alla massa delle informazioni raggiungibili.

***Abstract*:** Are presented some websites for swine enthusiasts, in Italian and in English as well. For each of them are indicated the aspects that, in the Author's view, are more positive and negative. We point that the web is an almost inexhaustible source of information, one of the major difficulties for the web surfer being to develop an adequate filtering capacity in front of the mass on information achievable.

Il mondo del web rappresenta una vera miniera di informazioni su qualunque argomento attinente qualsivoglia delle aree di conoscenza, o di semplice interesse, per il navigatore.
Non vi sono praticamente settori di applicazione della mente umana che non abbiano, ormai, un tangibile riscontro sulla rete: il problema del navigatore attento, come è noto, è quello di imparare ad essere selettivo nella scelta delle informazioni da assumere, distinguendo, se si discorre per esempio di aree attinenti l'ambito scientifico, tra informazioni consistenti, informazioni ideologicamente o culturalmente pre-orientate, informazioni commercialmente guidate, e informazioni semplicemente cialtrone. Impressionante è poi il fenomeno del copia-incolla, per cui alla lettera si possono trovare le stesse descrizioni dello stesso fenomeno su diversi siti, ognuno accampante patenti di originalità. La fonte più frequente da cui viene sottratto il materiale per il copia-incolla è wikipedia, la nota e meritoria enciclopedia online di pubblico dominio ed utilità: verificare per credere.
Stante la gigantesca dimensione della rete, a nessuno potrebbe ragionevolmente venire in mente di proporre una lista esaustiva di risorse web disponibili, su qualunque argomento: tuttavia un elenco ragionato di siti sul tema prescelto, unito ad una recensione derivante dalla loro frequentazione, può essere di interesse ed è l'argomento della presente rassegna, riguardante il mondo del suino, del suo allevamento e della sua salute.
Uno strumento quasi indispensabile di navigazione web è la lingua inglese, in forma non rudimentale: infatti la maggior parte delle risorse disponibili sono in quella lingua, pur essendovi possibilità anche in italiano oltre che ovviamente nelle altre lingue locali.
Siti in lingua italiana. Il maiale ha un discreto spazio sulla rete in lingua italiana: se non altro per ragioni di ospitalità il primo sito da considerare è www.sipas.org. In esso sono raccolti – in modo non del tutto intuitivo e non facilmente ricercabile – gli atti della

Società a partire dal 2002 ed i contenuti delle newsletter inviate periodicamente ai Soci: si possono inoltre reperire le informazioni aggiornate sui programmi e gli eventi programmati. Complessivamente dunque un tipico sito di servizio, puntuale ma non scoppiettante, nè sotto il profilo della forma nè sotto quello della sostanza.
Un secondo sito dedicato al maiale in lingua italiana è www.3tre3.it recentemente (ri)apparso in lingua italiana: contiene articoli sulla sanità, management, ambiente, biosicurezza, genetica e tanto altro, oltre alla descrizione di diversi casi clinici. Si comprende subito, fluttuando fra le diverse sezioni, che esso è parte di un navigato e sperimentato network internazionale. Nato in Spagna diversi anni fa, il network 3tre3 è ormai diffuso in quasi tutti i Paesi con una suinicoltura significativa, ed ora è declinato correttamente nelle diverse lingue locali. In realtà, tra i diversi siti del gruppo c'è una uniformità di formato, ma i contenuti non sono esattamente gli stessi, perciò non è inutile qualche puntata anche nelle altre nazionalità di 3tre3. Nel sito italiano è presente un quiz settimanale di patologia un po' imbarazzante, dato che le informazioni sul caso clinico sono quantomeno rarefatte, e quindi l'ottenimento di una risposta esatta è più legato al caso che alla capacità del giocatore ... tuttavia l'anonimato consente di fare brutte figure senza pagarne alcun dazio!
I report sulle pubblicazioni apparse (ABSTRACTS) sono piuttosto sintetici, ma generalmente ben comprensibili, mentre le referenze bibliografiche per raggiungere l'originale non sempre sono facilmente utilizzabili.
Dopo ogni abstract c'è uno spazio per post e commenti, evidentemente finalizzato all'idea di aprire discussioni sui temi sollevati: per ora la cosa non pare aver sollecitato risposte molto toniche da parte dei frequentatori, ma è giusto e lungimirante che la cosa ci sia. Prima o dopo anche noi italiani impareremo a discutere sul web e non solo ai mercati ...
Come molti siti di questo tipo, anche 3tre3 richiede una semplice procedura di registrazione per poter essere utilizzato nel pieno delle proprie potenzialità: una volta registrati, si riceve regolarmente sulla casella di posta una newsletter che rimanda alle novità apparse sul sito.
Un altro sito in italiano dedicato in via esclusiva e professionale al suino è www.suivet.it il cui nome (suini & veterinari) già ben descrive il "taglio" del prodotto: si tratta di un'eccellente vetrina di competenze tipicamente veterinarie. D'altro canto, gli artefici di questa iniziativa sono alcuni tra i più sensibili e appassionati colleghi operanti nel settore suinicolo. Lo schema organizzativo comprende, come molti altri siti, una parte di recensione bibliografica, ma ciò che rende davvero unico suivet è che esso gronda, in ogni pagina, di competenza personale, di passione ed amore per il mestiere, di piacere di condividere, e di magnanimità nel voler mettere a disposizione le proprie potenzialità.
Numerosi casi clinici o problematiche di allevamento vengono descritti con semplicità, competenza e ricchezza iconografica, così come vengono illustrate e proposte soluzioni e tecniche atte a migliorare particolari aspetti gestionali dell'allevamento.
La freschezza generale del sito, che è a nostro avviso la caratteristiche peculiare, discende quindi dalla sua specificità di essere "vissuto": quel che si trova su suivet – in larga maggioranza – è stato vissuto e metabolizzato personalmente dagli Autori, non è stato semplicemente riportato per averlo letto da qualche parte.
Anche l'accesso a suivet è vincolato ad un semplice processo di registrazione, ed anche suivet invia alla mail degli utenti registrati periodiche newsletter con richiami ai nuovi argomenti resisi disponibili. Inoltre, tramite Facebook, il noto social network che permette di rimanere in contatto con un gruppo di persone, alla pagina di suivet è possibile vedere, commentare e condividere aggiornamenti e articoli pubblicati da questo team di veterinari altamente specializzati nella cura del suino.
Tra le newsletter in italiano è bene ricordare l'opportunità di ricevere le sintetiche ma

sempre interessanti pagine dell'osservatorio ANAS (www.anas.it) che settimanalmente forniscono agli abbonati report sulle evoluzioni dei mercati e delle produzioni. Di recente introduzione, ma particolarmente utile al veterinario (stante la immanenza intrusiva delle norme sulla sua attività professionale) è la newletter normativasanitaria, diretta emanazione del Ministero della Salute (www.normativasanitaria.it) che informa con eccellente puntualità sull'uscita delle nuove norme e disposizioni in tema di sanità umana ed animale. Purtroppo non è possibile definire un profilo utente, e quindi si ricevono tutte le informazioni, non solo quelle di rilevanza veterinaria: è quindi necessario selezionare (operazione in verità abbastanza veloce) i link interessanti per il veterinario suiatra.
A titolo di commento finale sulle opportunità presenti in lingua italiana si può dire che vi sono buone chances per una navigazione "di lettura" (basata quindi sulla consultazione di qualche argomento del quale in qualche modo si è saputa la localizzazione) oppure di "surfing" (basata cioè sulla navigazione a vista, ricorrendo questo o quel titolo, o banner, o link trovato interessante). Più difficile invece è la ricerca di documenti di approfondimento su un argomento qualsiasi sul quale si voglia aumentare la conoscenza. In questo caso solo i motori di ricerca generalisti, come Google, possono essere di aiuto. La loro potenza e rapidità è davvero impressionante, tuttavia occorre ricordare che essi riportano nei risultati della ricerca tutto ciò che in base all'algoritmo trovano di attinente, senza esercitare alcun tipo di selezione, come è ovvio.
Ad esempio, digitando su Google le parole "aborto tardivo scrofa", supponendo di voler raccogliere maggiori informazioni sull'argomento, si ottengono 2300 risultati, le cui prime pagine spaziano tra i siti citati, ma anche ed utilmente sulle lezioni e sulle tesi di laurea messe online da alcune Facoltà italiane. Materiale dunque che può a ben diritto essere considerato come affidabile. Già a partire dalla terza pagina di risultati, però, l'attinenza rispetto al tema prescelto dei record ottenuti comincia a diventare intermittente, per poi scivolare inevitabilmente nella confusione del mare magnum delle frasi e delle pagine web che contengono casualmente ed in modo indipendente i termini utilizzati per la ricerca.
Si conferma quindi la necessità di una padronanza minima della lingua inglese per poter utilizzare utilmente lo strumento web.
Siti in inglese. Vi sono ovviamente numerosi – anzi, numerosissimi – siti attinenti il suino in lingua inglese: se ne descriveranno qui in lista certamente non esaustiva alcuni, il cui indirizzo non sarebbe probabilmente inutile nella cartella dei preferiti di ogni appassionato di suinicoltura. Le newsletter (che si ricevono in posta elettronica con link più o meno stimolanti ai contenuti del sito) sono uno strumento fondamentale di informazione, sia sotto il profilo tecnico-scientifico, che sotto quello politico-economico. Due siti in particolare paiono utili ed aggiornati sotto questo profilo.
Il primo, Pig Progress (www.pigprogress.net) è edito da una casa editrice olandese, e presenta informazioni scientifiche con dibattiti di buon livello (David Burch, Joannis Mavromichailis e John Gadd sono tra i più noti esperti che collaborano alla testata) insieme a informazioni sull'evoluzione dei mercati e sulle epidemie in corso nel mondo, senza dimenticare le notizie dalle Aziende, che come al solito sono il motore economico di questi prodotti grazie al contributo della pubblicità e della informazione scientifica. Il secondo ha una lunghissima storia: chi scrive ne legge le pagine – prima in forma cartacea e da qualche anno sul video – fin dal lontano 1977! Si tratta di Pig International (www.piginternational-digital.com) , una rivista "classica" che è possibile ricevere anche in carta, ma che per ovvie ragioni di costo è fortemente consigliato opzionare in forma digitale. Contiene anch'essa informazioni sui mercati, informazioni da Aziende e notizie tecnico-scientifiche in armonico equilibrio. La destinazione di Pig International non è tipicamente medico-

veterinaria, pertanto il livello è tendenzialmente più divulgativo, senza però mai scadere – va detto – nel banale o nel semplicistico. E' un prodotto americano, e talvolta questa "americanità" segna una qualche difficoltà a trattare gli argomenti in modo particolarmente stimolante per il lettore europeo.
Per una navigazione "di lettura" è giusto segnalare il sito Pigsite (www.thepigsite.com), che raccoglie anch'esso informazioni scientifiche in forma riassunta e pubblicità delle Aziende sponsor, senza riferimenti all'attualità. E' dotato di un motore di ricerca interno che esegue una semplice ma efficace ricerca di testo. Ad esempio, digitando la parola "abortion" nel banner di ricerca si ottengono 132 referenze, all'interno delle quali è possibile ricercare le attinenze all'aborto tardivo che utilizziamo come esempio comparativo. Data la logica testuale dell'algoritmo di ricerca, se digitiamo "late abortion" compaiono 1700 records, essendo "late" una parola largamente utilizzata: il risultato di questa ricerca è quindi, in pratica, inutilizzabile.
Un sito simile, ma piuttosto confuso sia nella veste grafica (in verità un po' troppo obsoleta come aspetto) che nella navigabilità, è Pighealth (www.pighealth.com). Esso mischia informazioni gratuite anche di buon livello con link a offerte commerciali (generalmente di libri più o meno attinenti gli argomenti richiesti). E' confuso, ma insistendo nella ricerca si può scaricare del materiale interessante. Digitando nella stringa di ricerca la parola "abortion" si ottengono 11 referenze, non tutte gratuite: per ottenere qualche informazione utilizzabile sugli aborti tardivi bisogna smanettare nel sito con pazienza e buona volontà.
Un sito ricco di informazioni indipendenti è quello della Associazione danese dei produttori di suini (www.danishpigproduction.com). E' pieno di informazioni interessanti, sia per quanto riguarda le istruzioni di allevamento sia soprattutto facendo riferimento ai rapporti interni sulle prove che continuamente vengono condotte nei loro centri sperimentali. Purtroppo il motore di ricerca non funziona bene, si inceppa continuamente ed è necessario "sfogliare" il sito manualmente. Digitando nella stringa di ricerca la parola "abortion" il sito si inceppa e non produce nessun risultato. Occorre inoltre dire che i titoli dei diversi report non indicano l'argomento, ma sono definiti semplicemente da un numero (divisi per macroaree) : se si vuol sapere cosa c'è dentro bisogna aprire il link. Un lavoro certosino (non è sorprendente un atteggiamento così criptico, trattandosi di danesi) ma che dischiude al navigatore più paziente una grande massa di informazioni indipendenti e talvolta sfacciate, come quando vengono offerti impietosi confronti tra prodotti commerciali offerti dal mercato, citandone senza remore i nomi, i cognomi e i prezzi.
Per una navigazione di ricerca sugli argomenti medici non è possibile prescindere da PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Esso è un sito gratuito curato dalla US National Library of Medicine, e riporta in forma di abstract quanto pubblicato, dagli anni '60 in poi, sulla letteratura scientifica riconosciuta. Per gli articoli che sono disponibili in testo completo ogni abstract rimanda con un link al sito di origine, preavvertendo se lo scaricamento dell'articolo è gratuito oppure (più frequentemente) a pagamento. Digitando le ormai famose tre parole "late abortion sows" PubMed rilascia 20 risultati, tutti attinenti, il più vecchio del 1977, il più recente del Marzo 2011. Di questi 20 risultati, 5 sono disponibili in testo completo e gratuito.
Per una navigazione di ricerca meno chirurgica ma molto più estesa è ovvio che Google può utilmente essere utilizzato: alle tre parole "late abortion sows" corrispondono oltre 2 milioni di risultati, che spaziano tra rimandi a siti citati, come PigSite, a siti delle Università, a proceedings di congressi, a informazioni tecnico-commerciali di Aziende del settore. La selettività non è facilissima da ottenere: il problema più complicato da risolvere è quello di gestire una massa così grande di informazioni. Troppo materiale, troppi siti da visitare,

troppi articoli da leggere. Anche in inglese comunque, dopo una decina di pagine Google comincia a proporre dei risultati via via meno attinenti al tema centrale.
Sono infine disponibili numerosi siti destinati all'appassionato di suinicoltura, in forma più rilassata, aventi lo scopo di sorridere, o anche solo semplicemente di giocare un po'. Tra i tanti, mi sento di proporre Virtual Walking the Pens (http://www.virtualwalkingpens.com/Default.aspx), una specie di gioco online nel quale si può visitare un allevamento (reso graficamente con buona fedeltà), identificare una varietà di problemi e proporre una varietà di soluzioni. Alla fine si viene inchiodati ad un punteggio di solito non molto lusinghiero: tuttavia è ben vero che applicandosi, come in tutti i videogiochi, si può migliorare... avendone il tempo! Il gioco deve essere scaricato sul computer e si comanda con la tastiera. Buon divertimento!
A conclusione di questa certo non esaustiva lista di risorse web a disposizione del swine enthusiast, non si può non ribadire come questo mezzo di comunicazione straordinario abbia completamente modificato l'approccio ai temi ed ai problemi, rendendo tutto più rapido, più immediato, e più ampio.
Ciò che fortunatamente rimane immutato (e che la tecnologia può aiutare a consolidare ma, se mal interpretata ed utilizzata, può confondere ed annacquare) è il principio secondo il quale, prima o poi, agli argomenti bisogna andare in fondo, consultando le fonti sulla base delle conoscenze di base e non limitandosi ad assumere informazioni riassunte, raccogliticce, e necessariamente superficiali.

ANALISI DEL CICLO DI VITA DI UN VACCINO PER IL CONTROLLO DELL'ODORE DI VERRO NELL'ALLEVAMENTO DI SUINI MASCHI

LIFE CYCLE ASSESSMENT OF A VACCINE AGAINST BOAR TAINT IN THE SWINE SECTOR

BALDO G.L.[1], BOERI F.[1], BORLA P.[1], G. MINELLI[2], GUARINI C.P.B.[2]

[1]Life Cycle Engineering (LCE), Torino, Italy; [2]Pfizer Animal Health – Italia

Parole chiave: Impatto ambientale, Analisi del ciclo di vita, vaccino, odore di verro, allevamento suini

Key Words: Environmental impact, Life cycle assessment, pig vaccine, boar taint, pig production

Riassunto

La metodologia LCA (Life Cycle Assessment) è stata utilizzata per la valutazione dell'impatto ambientale del ciclo di vita legato alla produzione ed utilizzo di un vaccino per la riduzione dell'odore di verro (*boar taint*) dalla carne suina. Pur non costituendo un problema per la sicurezza alimentare, il controllo dell'odore di verro è essenziale per la commercializzazione della carne dei maschi di maiale. La pratica comune, sempre meno accetta dall'opinione pubblica perché non rispettosa del benessere animale, prevede che il suino maschio venga castrato chirurgicamente nelle prime settimane di vita, aumentando così il rischio di mortalità.

Il vaccino costituisce una valida alternativa alla castrazione fisica poiché, oltre a controllare l'odore di verro, genera una serie di benefici tra i quali quello di tipo ambientale. I suini vaccinati infatti risultano più efficienti rispetto ai castrati sia in termini di conversione dell'alimento, sia di deposizione di massa magra.

Confrontando le due tipologie di allevamento, i risultati mostrano un miglioramento dei parametri ambientali considerati per il ciclo vita del maiale vaccinato. In particolare, la riduzione del *Carbon Footprint* (emissione di CO_2) rispetto al maiale castrato in questo sistema è dell'ordine di -4% sul peso vivo e sino al 5-6% sulla massa magra. Se applicato al numero di maiali maschi allevati nel mondo, questo può portare a valori assoluti di rilevanza nella logica delle politiche di riduzione dei gas ad effetto serra.

Abstract

The Life Cycle Assessment methodology (LCA) has been applied for the evaluation of the life-cycle environmental impact of the production and use of a vaccine against the boar taint of pork meat. Although not a food safety issue, effective control of boar taint is essential for the pork market and the actual practice for its elimination is the surgical castration early in the piglet life. The common practice, not much accepted by the public sector because not respectful of the animal welfare, provide physical castration in the

first days of piglets life, thus increasing the risk of mortality.
The vaccine is a valid alternative to physical castration as this, besides controlling boar taint, generates several benefits amongst which the environmental one. Vaccinated pigs result more efficient than castrated both in lean meat feed conversion and environmental impact, as they eat less feed in proportion to the meat produced.
By comparing the two different pig rearing typology, the study shows a reduction in the environmental impacts considered for the vaccinated pig life cycle. In particular, the reduction of the *Carbon Footprint* associated to the system is of the order of -4% measured on live-weight and up to 5-6% on a lean meat basis when compared to castrated pig; this reduction, applied to the whole number of male pig, is relevant in terms of Greenhouse Gases reduction policies.

INTRODUZIONE

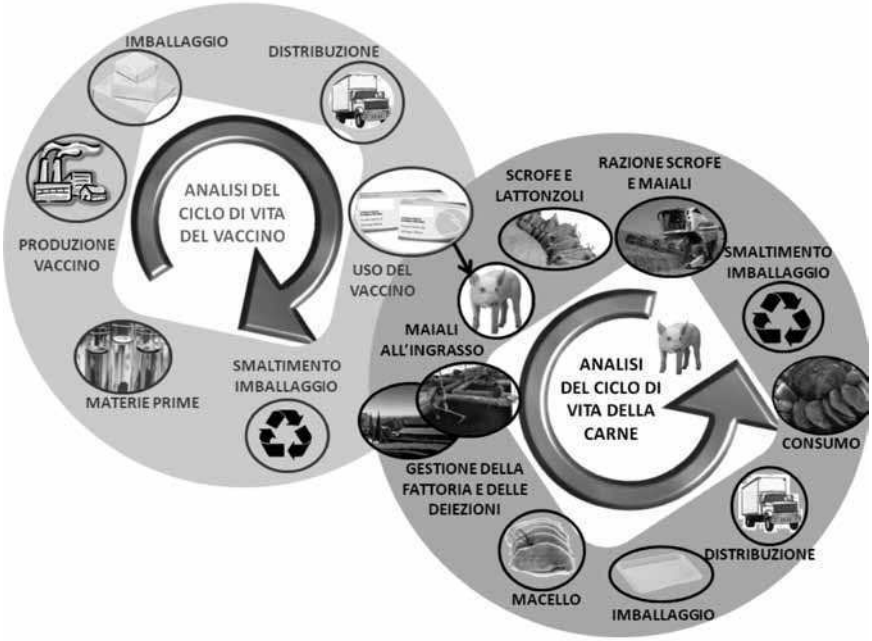
Con il termine odore di verro si fa riferimento all'odore/sapore di urina, feci e sudore che si manifesta durante la cottura o il consumo di carne ottenuta da suini maschi non castrati, macellati dopo la pubertà. L'odore di verro si sviluppa in seguito all'accumulo nel grasso dei suini maschi di due composti: androsterone (steroide prodotto nei testicoli del maiale dopo il raggiungimento della maturità sessuale) e scatolo (prodotto intestinale del catabolismo del triptofano).
Attualmente, a livello mondiale, oltre il 90% dei suini maschi viene castrato fisicamente: per contrastare l'insorgenza dell'odore di verro nella carne di maiale. La castrazione fisica tuttavia, oltre a costituire un rischio per la salute dell'animale per l'aumento della mortalità, risulta sempre meno accetta dall'opinione pubblica perché non rispettosa del benessere animale.
Per venire incontro sia alle esigenze di commercializzazione che alla crescente attenzione dei consumatori nei confronti del benessere animale, la Commissione Europea ha invitato rappresentanti degli allevatori europei, dell'industria delle carni, dei dettaglianti, accademici e veterinari a sottoscrivere un accordo che prevede il bando della castrazione fisica a partire dal 2018 e l'obbligo della somministrazione di anestesia e/o analgesici pre-castrazione già dal gennaio 2012.
Diverse alternative alla castrazione chirurgica sono già in uso sia in Europa che in altri stati, tra cui l'allevamento di maschi interi e la vaccinazione contro l'odore di verro (immunocastrazione).

MATERIALI E METODI

Lo studio relativo al vaccino ed al suo utilizzo nella filiera di produzione della carne è stato sviluppato utilizzando come strumento di valutazione la metodologia di Analisi del Ciclo di Vita (LCA – Life Cycle Assessment), regolata dagli standard internazionali ISO Serie 14040, che permette di correlare le diverse operazioni del modello per determinare gli impatti ambientali in termini di consumo di risorse e rilasci verso l'ambiente; il sistema analizzato è schematizzato in Figura 1.

Figura 1. Schema illustrativo del sistema vaccino e della sua relazione con il sistema di produzione della carne di maiale. I due sistemi collegati tra di loro costituiscono la il

modello LCA predisposto allo scopo di evidenziare il carico ambientale associato alla produzione e all'utilizzo del vaccino stesso.



Le categorie d'impatto prese in considerazione nello studio sono: Potenziale Effetto Serra (GWP), Acidificazione, Eutrofizzazione, Riduzione dell'Ozono e Fotosmog.
L'identificazione degli allevamenti rappresentativi di ogni macro regione (Australia, Belgio, Brasile, Cile, Cina e Colombia) si è sviluppata sulla base di una procedura di campionamento che ha tenuto conto di vari fattori, come la dimensione dell'allevamento, la taglia dei maiali (con un limite di 30 settimane di crescita) nonché tenendo conto della possibilità di raccogliere informazioni precise sulla gestione ordinaria.
Le fonti di informazioni utilizzate derivano da:
a) questionari LCA con dati primari raccolti presso allevamenti che utilizzano il vaccino.
b) "Study trials", condotti per conto della casa produttrice del vaccino, comprendenti dati primari relativi ad altri allevamenti campione che utilizzano il vaccino e la castrazione fisica; l'elaborazione dei dati ottenuti ha evidenziato le differenze tra le due tipologie soprattutto in termini di conversione in massa corporea (il risultato ottenuto attesta un miglioramento nell'indice di conversione del maiale vaccinato dell'ordine del 6%.)
c) Banche dati LCA per valutare il contributo di operazioni come uso di energia, trasporti, packaging, ecc.

Unità funzionale e confini del sistema
Il sistema analizzato nello studio LCA parte dalla produzione delle materie prime necessarie alla produzione del vaccino e si conclude con la produzione della carne di maiale ed il fine vita del vaccino stesso. Lo studio ha considerato i seguenti sottosistemi e unità funzionali (Figura 2):

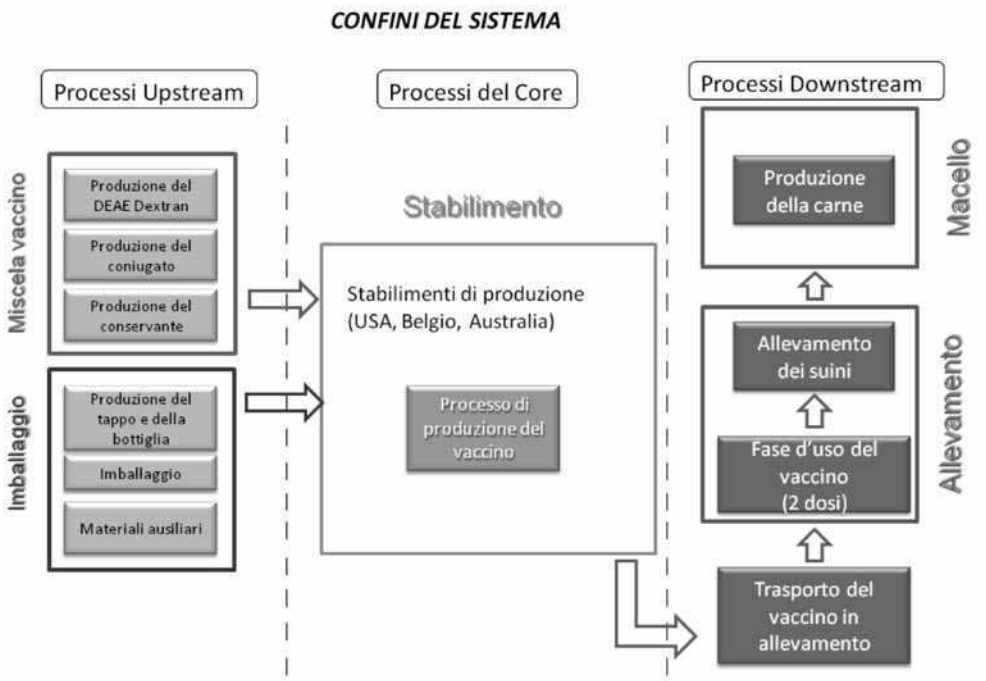


Figura 2. I confini del sistema considerato.

UPSTREAM (Livello: fornitori dei composti e dei semilavorati di base): tiene conto di tutte le operazioni dall'estrazione delle materie prime all'ingresso nell'impianto di produzione; l'unità funzionale è pari a 2 dosi di vaccino (2 ml/dose), che rappresenta l'esatta quantità per ottenere la castrazione immunologica
CORE (Livello: impianti di produzione del vaccino): tiene conto di tutte le fasi previste all'interno degli stabilimenti considerati per la produzione del vaccino; l'unità funzionale anche in questo caso è pari a 2 dosi di vaccino. I dati sono stati raccolti tramite appositi questionari e mediati tenendo conto della produzione annua di vaccino presso ogni impianto.
DOWNSTREAM (Livello: allevamenti e macelli fino alla produzione di carne di maiale): include le fasi di gestione degli allevamenti, di utilizzo del vaccino, e la macellazione del suino; l'unità funzionale considerata è costituita da 1 kg di maiale in uscita dall'allevamento ("**1 kg peso vivo**"); i risultati sono stati inoltre riportati all'unità di massa di prodotto dopo la macellazione (**1 kg di carcassa** o **1 kg di carne magra**) attraverso opportuni fattori di conversione.
Il dettaglio del modello non è stato riportato nel dettaglio per ragioni di spazio, ma rimane disponibile presso gli autori.

Nell'ambito dei processi correlati alla produzione del vaccino sono stati considerati oltre ai consumi di stabilimento anche i trasporti delle materie prime/semilavorati agli stabilimenti nonché del prodotto finito verso i luoghi di utilizzo.
Nell'ambito delle fasi di allevamento e macello, i bilanci di massa e di energia ricavati sulla base dei dati raccolti presso gli allevamenti campione sono stati riportati all'anno di attività (2011), tenendo conto del contributo delle scrofe e della durata del ciclo di allevamento dei

suini (dallo svezzamento fino alla fase di ingrasso); i dati assoluti sono stati suddivisi sul numero totale di suini inviati al macello in modo tale da considerare nell'analisi anche il tasso reale di mortalità degli animali. I dati LCA utilizzati per modelizzare le filiere agricole specifiche per la produzione degli alimenti si riferiscono alle rese di coltivazione relative a ciascun mangime per i diversi paesi, permettendo di contabilizzare il carico ambientale delle razioni a seconda della dieta caratteristica. Per quanto riguarda le emissioni imputabili ai suini e alla gestione delle deiezioni, i principali elementi considerati riguardano le fermentazioni enteriche, le emissioni di ammoniaca dalle urine e le emissioni dovute alla gestione delle deiezioni, elemento chiave nella determinazione dell'impatto ambientale.

RISULTATI

I risultati sono presentati in tabella 1, dove vengono riportati i principali indicatori di impatto di tipo LCA per le fasi di upstream e core (approvvigionamento materie prime e produzione del vaccino) e dowstream (fase d'uso del vaccino/allevamento dei maiali); tra questi, fotosmog e riduzione dell'ozono risultano trascurabili.

Tabella 1 Impatti ambientali potenziali del sistema maiale vaccinato (valori approssimati).

INDICATORI D'IMPATTO		PROCESSI UPSTREAM	PROCESSI CORE	PROCESSI DOWSTREAM
UNITÀ FUNZIONALE		**2 dosi di vaccino**	**2 dosi di vaccino**	**1 kg di maiale a peso vivo**
Potenziale Effetto Serra (GWP)	**g CO_2 equiv.**	11	28	5346
Acidificazione	**g SO_2 equiv.**	<0,1	<0,1	57
Eutrofizzazione	**g PO_4^{3-} equiv.**	<0,1	<0,1	50
Riduzione dell'Ozono	**g CFC11equiv.**	trascurabile	trascurabile	trascurabile
Fotosmog	**g C_2H_4 equiv.**	<0,1	<0,1	2

Potenziale Effetto Serra

Per la fase di produzione del vaccino (processi di upstream e core), la produzione e l'utilizzano di energia elettrica contano circa il 60% sul potenziale effetto serra legato all'utilizzo di risorse fossili; rispetto all'utilizzo di risorse biogeniche, invece, il contributo principale proviene dalla produzione di un componente del vaccino, che deriva dalla fermentazione microbica dell'etanolo. Rispetto alla fase di allevamento (processo di downstream), il potenziale effetto serra è dominato dalla produzione dei mangimi somministrati al maiale ed alle emissioni delle deiezioni prodotte, come mostrato in figura 3.

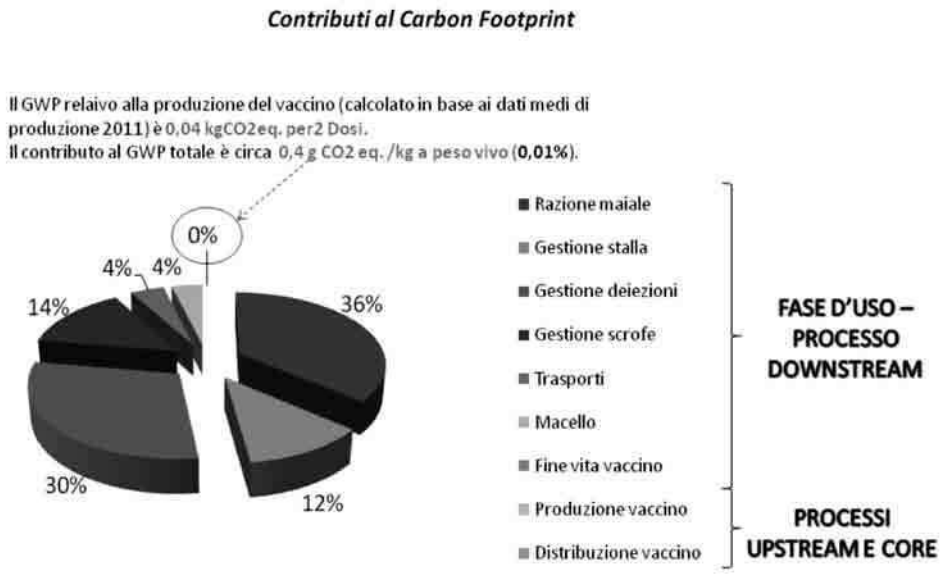


Figura 3. Principali contributi al Carbon Footprint dell'allevamento di un suino.

Acidificazione
Durante la fase di produzione del vaccino, l'impatto legato all'acidificazione è dovuto principalmente all'energia utilizzata negli stabilimenti, in particolar modo al carbone bruciato nelle centrali elettriche; durante l'allevamento del maiale le emissioni sono dovute in gran parte alla gestione delle deiezioni.
Eutrofizzazione
L'impatto eutrofico nella fase di produzione del vaccino proviene principalmente dalla biomassa coltivata per la produzione di etanolo (componente importante del vaccino), nella fase di utilizzo è legata alle emissioni di campo da parte di letame e fertilizzanti.

DISCUSSIONE
Lo studio LCA ha messo in luce alcuni aspetti interessanti dei due sistemi analizzati; prima di tutto, risulta evidente come la produzione del vaccino sia trascurabile rispetto alle altre fasi del ciclo di vita considerato, in secondo luogo la vaccinazione consente di ottenere una riduzione di tutti gli impatti ambientali di ciclo vita rispetto alla castrazione fisica. In particolare, focalizzando l'attenzione al *Carbon Footprint*, le emissioni di CO_2 equivalente del sistema vaccino (Tabella 2) risultano essere più basse di circa il 4%, se rapportate al kg di animale vivo (kg live weight), e del 5-6% nel caso della carne magra (kg lean meat).
Considerando un animale di massa complessiva di circa 110 kg (peso vivo), il Carbon Footprint risparmiato è dell'ordine dei 20 kg di CO_2 equivalente, che corrisponde a circa 130 km percorsi da una auto di piccole-medie dimensioni (100 km percorsi da un suv).

Tabella 2 - Carbon Footprint per le tre unità funzionali considerate nello studio LCA del vaccino

Carbon Footprint e Consumo totale di energia per le tre unità funzionali nell'LCA del vaccino				
INDICATORI D'IMPATTO		**1 kg di maiale a peso vivo**	**1 kg carcassa dopo il trattamento**	**1 kg di carne magra**
Potenziale Effetto Serra (GWP) [carbon footprint]	**kg CO_2 equiv.**	5,4	7,0	12,8

CONCLUSIONI

Il progetto ha evidenziato il valore aggiunto in termini di riduzione dell'impatto ambientale di ciclo vita derivante dall'uso del vaccino rispetto alla pratica tradizionale di castrazione fisica per la riduzione dell'odore di verro nella carne suina proveniente da animali maschi. Oltre al beneficio diretto a livello delle performance di allevamento (riduzione della mortalità e delle infezioni, animali più efficienti nella trasformazione dell'alimento in massa magra), l'utilizzo del vaccino ha ricadute positive sulla filiera rispondendo ad una crescente sensibilità dei consumatori nei confronti miglioramento del benessere animale.

BIBLIOGRAFIA

Allison J. , McKeith F., C Souza, Boler D., Killefer J. Hennessy D. (2009) "Impact of using vaccination with IMPROVAC® rather than physical castration on the carcass characteristics of finishing male pigs" in ICOMST "55th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen 16-21 August 2009" Denmark, paper n° 7.38,.

Basset-Mens C., Van der Werf H.M.G. (2005) "Scenario-based environmental assessment of farming systems: the case of pig production in France". Agri Ecosyst Environ 105,127–144.

Basset-Mens C., Van der Werf H.M.G., Durand P., Leterme P. (2006) "Implications of Uncertainty and Variability in the Life Cycle Assessment of Pig Production Systems", Int J LCA 11 (5), 298-304.

Cederberg C., Flysjö A. (2004) "Environmental assessment of future pig farming systems - quantifications of three scenarios from the FOOD 21 Synthesis Work", The Swedish Insitute for fodd enad biotechnology SIK-rapport Nr 723.

Dunshea F., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Lopaticki S., Nugent E.A., Simons J.A., Walker J., Hennessy D.P. (2001) "Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac®) eliminates boar taint and increases growth performance" J. Anim. Sci. 79, 2524–2535.

Nemececk T., Kagi T. (2007) "Life Cycle Inventories of Agricultural Production Systems", Ecoinvent v 2.0 Report n°15.

European Commission (2003) "Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) Reference Document on Best Available Techniques for Intensive Rearing of Poultry and Pigs" JRC, http://eippcb.jrc.es/reference/..

European Commission (2005) "Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC) Reference Document on Best Available Techniques in the Slaughterhouses and Animal By-products Industries" JRC, http://eippcb.jrc.es/reference/.

European Commission (2010) "Regulation (EC) No 66/2010 of the European Parliament and

of the council of 25 November 2009 on the EU Ecolabel Award Scheme", Official J EU, IV, 1-19.
Fàbrega E., Velarde A., Cros J., Gispert M., Suárez P., Tibau J., Soler J. (2010) "Effect of vaccination against gonadotrophin-releasing hormone, using Improvac®, on growth performance, body composition, behaviour and acute phase proteins" Livest Prod Sci 132, 53–59.
Finkbeiner M (2009) "Carbon footprinting—opportunities and threats" Int J Life Cycle Assess 14(2), 91–94.
Frank J., Maxwell C., Thoma G. (2009) "Greenhouse gas emissions and global warming potential of the U.S. swine industry: review of the literature from a life cycle perspective", Arkansas University.
IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories (2006) - Volume 4 Agriculture, Forestry and Other Land Use -Chapter 10 Emissions from livestock and manure management. http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html.
IPCC, 2007: Climate Change 2007 The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007 [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)] Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA 2007.
ISO 14020 (2000) Environmental labels and declarations—general principles, www.iso.org .
Lopez-Ridaura S., Deltour L. , Paillat J.M., van der Werf H.M.G. (2008) "Comparing options for pig slurry management by Life Cycle Assessment"; 6th International Conference on LCA in the Agri-Food Sector, Zurich, 12–14 November 2009" Swizerland, 360-369.
Meissner Schau E., Magerholm Fet A. (2008) "LCA Studies of Food Products as Background for Environmental Product Declarations" Int J LCA 13 (3), 255 – 264.
Morales J., Gispert M., Hortos M., Pérez J., Suárez P., Piñeiro C. (2010) "Evaluation of production performance and carcass quality characteristics of boars immunised against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) compared with physically castrated male, entire male and female pigs" SJAR 8(3), 599-606.
Pfizer Animal Health (2011) "Environmental Product Declaration of Improvac (N° S-P-00261)". The EPD International System, www.environdec.com
The International EPD Cooperation, IEC (2008) "SUPPORTING ANNEXES for Environmental Product Declarations EPD" version 1.0 dated 2008-02-29, www.environdec.com .
Jungbluth T., Hartung E., Brose G. (2001) "Greenhouse gas emissions from animal houses and manure stores"; Nutr Cycl Agroecosys 60, 133–145,.
Wiedemann S., McGahan E., Grist S., Grant T. (2010) "Environmental Assessment of Two Pork Supply Chains Using Life Cycle Assessment, Australian Government" RIRDC Publication No 09/176.
European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections (2009) – "REVISED GUIDELINE ON ENVIRONMENTAL IMPACT ASSESSMENT FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS IN SUPPORT OF THE VICH GUIDELINES GL6 AND GL 38", http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004386.pdf.

SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI DA SUINO

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM SWINE

VIO D.*, USTULIN M.*, DI GIUSTO T.**, DEOTTO S.**, DRIGO, I.***, TONON F.****, GIORGIUTTI M.*****, CONEDERA G.*, COCCHI M.*

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone*
*** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Udine*
**** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Treviso*
***** Medico Veterinario libero-professionista, San Vendemmiano (TV)*
****** Medico Veterinario libero-professionista, Pagnacco (UD)*

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, antibiotico sensibilità, suino
Key words: antimicrobial susceptibility, *Staphylococcus aureus*, swine

Riassunto. *Staphylococcus (S.) aureus* è un batterio Gram positivo, frequentemente associato a patologie sia nell'uomo che negli animali. In seguito all'introduzione della penicillina si è assistito rapidamente alla diffusione di ceppi resistenti; analogamente per la meticillina i ceppi resistenti sono comparsi poco tempo dopo l'inizio del suo utilizzo in ambito terapeutico. La segnalazione di ceppi *S. aureus* meticillino resistenti negli animali ha posto un grave problema in sanità pubblica per la possibilità di trasmissione all'uomo. Detti ceppi presentano resistenza a più classi di antimicrobici contemporaneamente. Diversi studi condotti hanno mostrato una differenza geograficamente variabile di prevalenza. Scopo del presente studio è stato valutare il *pattern* di antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* isolati dal suino. 44 ceppi sono stati sottoposti a test di sensibilità agli antimicrobici seguendo le linee del CLSI. I risultati mostrano una elevata percentuale di resistenza a penicillina, ampicillina e tetraciclina (93%), mentre una resistenza pari al 20% dei ceppi esaminati nei confronti del sulfamidico potenziato. Il 23% dei ceppi testati presentavano resistenza alla meticillina e ad altre molecole, quali penicillina, ampicillina e tetraciclina.

Abstract. *Staphylococcus (S.) aureus* is a Gram positive bacterium. It is frequently involved in opportunistic infections both in humans and in animals. It can cause heavy economic losses in animal farms due to pathology and to treatment costs. The emergence of "livestock associated" methicillin-resistant *S. aureus* has raised the role of this bacterium in pigs. Moreover the resistance to commonly used antimicrobials is normally associated to *S. aureus* strains. In human beings resistant strains have been reported shortly after the introduction of penicillin in therapeutic field. Similarly after the introduction of methicillin, resistance was detected. These strains are widely distributed and are characterized by multidrug resistance. Emerging resistance to different molecules, particularly among methicillin resistant *S. aureus* represents a risk to public health. As the prevalence of resistance is geographically variable, local investigations should be performed. The objective of this study is to characterize the antimicrobial susceptibility

of 44 *S. aureus* strains isolated from swine trough 2011. Methicillin-resistance and MIC to vancomicin were evaluated, too. Resistance was most common to penicillin, ampicillin and tetracycline (93%). Resistance to sulfamethoxazole/trimethropim was 20%, and there was no resistance to cephalotin. In 3 farmers methicillin-ressitant strains were identified, with a total of 10 strains. These strains appeared to be multidrug resistant.

INTRODUZIONE

Staphylococcus (S.) aureus è un microrganismo Gram positivo, responsabile di numerose patologie negli animali. Nel suino *S. aureus* è responsabile di mastite, vaginite, metrite e formazione di ascessi in seguito a fenomeni batteriemici (B. E. Straw, 2006). In generale, i batteri Gram positivi sono considerati patogeni importanti non solo in ambito veterinario ma anche in medicina umana, dove causano gravi infezioni nosocomiali (Rice L.B., 2006). Per quanto riguarda *S. aureus* esso è responsabile di infezioni a carico dei tessuti molli e duri che possono evolvere in gravi batteriemie. Esso svolge la sua azione patogena sia tramite l'elaborazione di tossine, che causano lisi delle cellule della serie rossa (emolisine), della serie bianca (leucocidina), o che possono svolgere azione fibrinolitica (stafilochinasi), sia tramite la produzione di enzimi che conferiscono al microrganismo la capacità di resistere all'azione di una o più classi di antimicrobici. Lo sviluppo dell'antibiotico resistenza in ceppi di S aureus è ampiamente documentata: la resistenza alla penicillina è stata segnalata pochi anni dopo la sua introduzione per scopi terapeutici e, analogamente, la successiva introduzione della meticillina ha determinato la comparsa di ceppi meticillino-resistenti (MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Essi rivestono importanza in sanità pubblica, sia per la presenza della resistenza a più classi di antibiotici, sia per la recente ipotesi di diffusione di cloni nell' animale e nell'uomo (Lewis *et al*., 2008). I primi ceppi MRSA sono stati isolati in ambito ospedaliero (HA-MRSA, hospital acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), mentre recentemente sono stati segnalati ceppi definiti community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA–MRSA), geneticamente non correlati ai ceppi HA-MRSA, e identificati in casi caratterizzati da fattori di rischio differenti da quelli definiti per i ceppi HA-MRSA (Foster, 2004). La meticillino resistenza è codificata a livello cromosomiale e determina la formazione di una proteina con una bassa affinità per gli antibiotici beta – lattamici. In ambito umano, inoltre, l'attenzione nei confronti dei ceppi di MRSA è stata ampliata allo studio della resistenza alla vancomicina (molecola usata nella terapia delle infezioni da MRSA) per la comparsa di ceppi VRSA, vancomicin resistant *Staphylococcus aureus*. Questa resistenza è causata dal trasferimento orizzontale di un transposone contenente il gene *vanA* e geni associati, da ceppi di *Enterococcus* vancomicina resistenti. In ambito veterinario, ceppi MRSA sono stati descritti nel suino e nel bovino (Foster, 2004). Dal momento che la terapia antibiotica costituisce un punto essenziale nel trattamento e nel controllo di queste infezioni, e considerando il possibile trasferimento di fattori di resistenza dall'animale all'uomo, il monitoraggio della comparsa e della diffusione di ceppi resistenti costituisce punto importante per le implicazioni sia terapeutiche sia di sanità pubblica. Scopo del presente studio è stato fornire informazioni sulla prevalenza dell'antibiotico resistenza in ceppi di *S aureus* isolati da tampone nasale di suino, determinando la sensibilità a cinque molecole antibiotiche e valutando inoltre la presenza della meticillino resistenza e della sensibilità alla vancomicina.

MATERIALI E METODI

Analisi batteriologica. Nel periodo ottobre-dicembre 2011, sono stati collezionati 160 tamponi nasali da 8 scrofaie considerate rappresentative per tipologia di allevamento e numero di animali allevati degli allevamenti da riproduzione delle regioni Friuli Venezia Giulia e Veneto. In ogni azienda sono stati eseguiti 20 tamponi da singole scrofe clinicamente sane.

In laboratorio, i tamponi sono stati inoculati su Heart Infusion Broth (fornito dal Centro Servizi alla Produzione, IZSVe) per 24 ore a 37 ± 1 °C. Successivamente, dalla brodocoltura un'ansata di materiale è stata seminata su agar sangue (fornito dal Centro Servizi alla Produzione, IZSVe) e su mannitol-salt-agar (Oxoid). I terreni sono stati incubati a temperatura di 37 ± 1 °C per 24-48 ore. Al termine del periodo di incubazione dalle colonie sospette Staphylococcus spp sono state eseguite prove biochimiche di identificazione: colorazione di Gram, test della catalasi, test della coagulasi (plasma di coniglio), test di sensibilità alla polimixina B (300 mg, Oxoid).

L'identificazione biochimica è stata confermata utilizzando un sistema biochimico miniaturizzato (API STAPH - Biomerieux).

Test di sensibilità agli antimicrobici. I ceppi batterici identificati come S. aureus sono stati sottoposti a test di sensibilità agli antimicrobici usando il metodo dell'agar diffusione, in accordo con le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I principi attivi utilizzati sono stati i seguenti: penicillina (P, 10 mg – Becton Dickinson-), ampicillina (AMP, 10 mg – Becton Dickinson -), tetraciclina (TE, 30 mg – Oxoid -), sulfametoxazolo+trimethropim (SXT, 1,25 mg – Oxoid -) e cefalotina (CFL, 30 mg – Oxoid -). Gli isolati sono stati classificati in sensibile, intermedio, resistente, in accordo con quanto riportato dal CLSI.

L'analisi della meticillino resistenza è stata condotta utilizzando il test dell'agar diffusione, introducendo un dischetto di oxacillina (OXA, 10 mg – Becton Dickinson -) e uno di cefoxitina (FOX, 30 mg – Oxoid-), secondo quanto descritto dal CLSI. Nel presente studio, inoltre, il tampone è stato inoculato su terreno Oxacillin Resistance Screening Agar Base, ORSAB (Oxoid), incubato a 37°C ± 2 per 24 ore.

Analisi molecolare. Tutti i ceppi sono stati sottoposti alla ricerca per il gene mecA. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). La ricerca gene mecA è stata eseguita secondo quanto descritto da Louie et al, 2002 (9).

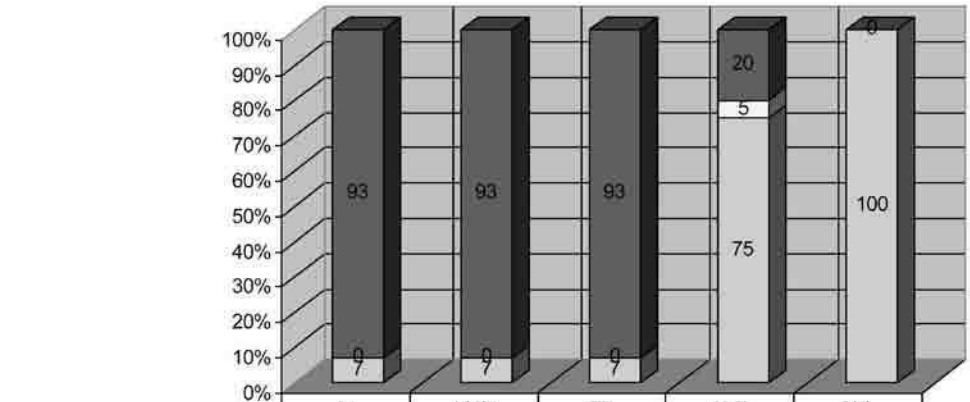
Per quanto riguarda la vancomicina è stata eseguita MIC con micro diluizione.

RISULTATI

Analisi batteriologica. *S. aureus* è stato identificato in 44 dei 160 tamponi nasali eseguiti (27%), appartenenti a 7 differenti allevamenti.

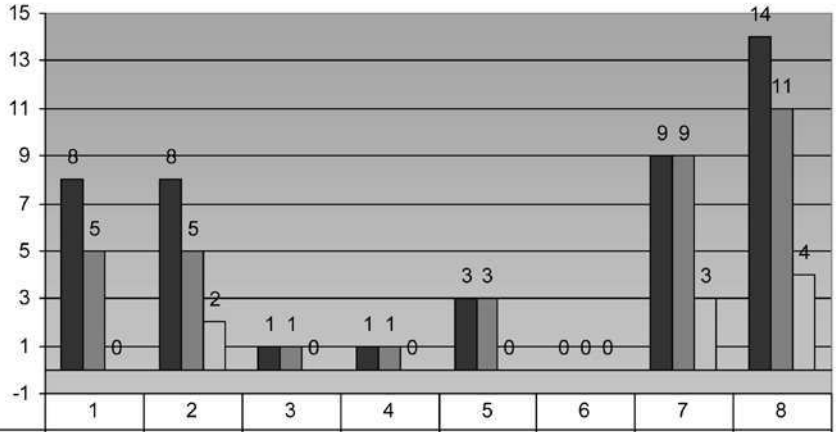
Test di sensibilità agli antimicrobici. 41/44 (93%) dei ceppi testati presentavano resistenza a P, AMP e TE. 9/44 (20%) erano resistenti a SXT, mentre tutti i ceppi di *S. aureus* risultavano sensibili alla CFL. Tutti i ceppi resistenti a P erano resistenti anche ad AMP e a TE e i nove ceppi resistenti al SXT erano resistenti anche a P, AMP e TE. In totale, 35/44 (79%) ceppi mostravano resistenza a P+AMP+TE, mentre 9/44 (20%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT. In figura 1 e 2 sono riportate le percentuali dell'antibiotico resistenza riferita alla singola molecola e a più molecole, rispettivamente.

Figura 1. SENSIBILITÀ (ESPRESSA IN PERCENTUALE) DEI CEPPI ALLE MOLECOLE TESTATE.
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST TO THE DIFFERENT DRUG'S CLASSES



	P	AMP	TE	SXT	CFL
percentuale ceppi resistenti	93	93	93	20	0
percentuale ceppi intermedi	0	0	0	5	0
percentuale ceppi sensibili	7	7	7	75	100

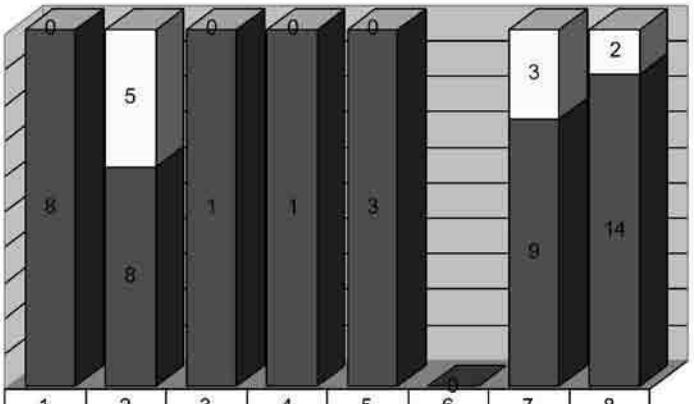
Figura 2. RESISTENZA A PIÙ CLASSI DI ANTIMICROBICI TESTATI, SUDDIVISI PER ALLEVAMENTO.
MULTIDRUG RESISTANT STRAINS



	1	2	3	4	5	6	7	8
TOT SA	8	8	1	1	3	0	9	14
P+AMP+TE	5	5	1	1	3	0	9	11
P+AMP+TE+SXT	0	2	0	0	0	0	3	4

Meticillino - resistenza. 10/44 (23%) ceppi appartenenti a tre aziende, presentavano resistenza all'OXA e alla FOX. Tutti i ceppi MRSA erano inoltre resistenti a P, AMP, e TE, e di questi 3 (30%) risultavano resistenti anche al SXT. Tutti i ceppi meticillino resistenti presentavano il gene *mecA* ed erano cresciuti su ORSAB. In figura 3 la distribuzione per allevamento dei ceppi MRSA identificati nel presente studio.

Figura 3. NUMERO DI CEPPI MRSA/NUMERO DI CEPPI DI *S. AUREUS* IDENTIFICATI PER ALLEVAMENTO.
DISTRIBUTION OF MRSA IN EACH FARM.



	1	2	3	4	5	6	7	8
□ numero di MRSA identificati	0	5	0	0	0	0	3	2
■ numero totale di ceppi isolati	8	8	1	1	3	0	9	14

Per quanto riguarda la resistenza alla vancomicina, 9/10 ceppi presentavano una MIC pari a 0,5 mg/ml, mentre un ceppo presentava una MIC pari a 1 mg/ml.

DISCUSSIONE

Nel presente studio, i ceppi hanno mostrato una elevata resistenza a penicillina, ampicillina e tetraciclina (93%), in accordo con quanto descritto da altri autori. Secondo Rubin *et al.* (2011), infatti, i ceppi di *S. aureus* isolati da suino presentano una resistenza a tetraciclina e penicillina molto più alta rispetto a quanto riscontrato in ceppi isolati dal cavallo, dal bovino e dall'avicolo. Baba *et al.* (2011), riportano una resistenza alla P pari al 93.8% negli isolati suini, rispetto a valori del 22.0% e del 10.7% negli isolati bovini e avicoli, rispettivamente. I dati, diversamente da quanto presentato in questo lavoro, sono riferiti ad isolati suini di *S. aureus* ottenuti in caso di dermatite e artrite. Nel nostro caso i ceppi derivavano da animali senza segni clinici riferibili a patologie da stafilococco. La resistenza a queste molecole è probabilmente imputabile all'utilizzo delle stesse in allevamento: secondo Van Djiurken et al (2008) gli isolati suini sono ampiamente resistenti alla tetraciclina, per l'ampio utilizzo che ne viene fatto in terapia. La presenza di questa resistenza sarebbe inoltre legata alla presenza di particolari spa-tipi e lineaggi genetici di *S aureus* diffusi in diversi paesi europei. Inoltre, la resistenza a più classi di antibiotici testati risulta variare dal 20% (P+AMP+TE+SXT) al 79% (P+AMP+TE), dato in accordo con quanto riportato da Baba *et al* (2011), i quali sottolineano come il 68.8% dei ceppi sottoposti ad indagine risultavano resistenti a due o più classi di

antimicrobici. Per quanto concerne lo studio della meticillino resistenza, l'utilizzo del terreno ORSAB su cui è stato inoculato direttamente il campione ha dato esiti concordi con quanto rinvenuto con il metodo dell'agar diffusione (sia con l'utilizzo della molecola dell'oxacillina che con quella della cefoxitina) e con i risultati della biologia molecolare. L'indagine circa la presenza di ceppi MRSA è collegata all'importanza che i ceppi CA-MRSA hanno assunto nel tempo. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA, 2009) ha pubblicato nel 2009 la prima indagine a livello comunitario sull'MRSA nei suini da riproduzione, sottolineando come possa essere comunemente rinvenuto in questa tipologia di allevamento. L'EFSA ha pubblicato inoltre un parere sulla rilevanza, in termini di salute pubblica, della presenza di MRSA in alimenti e animali. In questo parere si sottolinea come la contaminazione degli alimenti da MRSA sia ritenuta possibile. E' stato sottolineato che gli individui a contatto con animali vivi, caratterizzati da alta prevalenza di MRSA, sono sottoposti ad un rischio maggiore rispetto alla popolazione in generale. L'EFSA afferma che il contatto diretto con animali vivi e con il loro ambiente può essere una delle principali modalità di trasmissione all'uomo. Pertanto il monitoraggio della presenza in allevamento di ceppi MRSA costituisce un importante mezzo di controllo della diffusione degli stessi, considerando anche la differente distribuzione sul territorio europeo dei ceppi MRSA. In ambito buiatrico, studi multicentrici hanno evidenziato una differente distribuzione dei ceppi MRSA, con un *range* che varia da un valore di prevalenza pari allo 0% (studio norvegese) a un valore pari al 10% (studio belga) (Bengtsson B. *et al*., 2009; Vanderhaeghen W. *et al*.,2010). Analoghe differenze sono riportate anche nell'allevamento suino (Lewis H.C. *et al*., 2008), sottolineando l'importanza della conoscenza della prevalenza rapportata ai vari territori di allevamento del suino.

Per diversi anni la vancomicina è stato l'unico trattamento efficace nei confronti delle infezioni sostenute da MRSA nell'uomo: a partire da metà degli anni '90, sono stati identificati ceppi di S. aureus con un profilo di resistenza intermedio alla vancomicina (VISA, vancomicin-intermediate *S. aureus*). La comparsa di questi ceppi è stata associata epidemiologicamente a soggetti sottoposti a terapia prolungata nel tempo (25 giorni a 18 settimane) (Rice L.B., 2006). In accordo con quanto riportato nel manuale del CLSI, i ceppi VISA sono quelli che presentano una MIC fra 4mg/ml e 8mg/ml, mentre i ceppi VISA eterogenei sembrano essere sensibili alla vancomicina ma contengono subpopolazioni con ridotta sensibilità alla vancomicina: ad oggi questa situazione è associata a valori di MIC compresi fra 1 mg/ml e 2 mg/ml. Dati concernenti la ridotta efficacia clinica dei glicopeptidi sono stati recentemente pubblicati in ceppi con MIC fra 1 mg/ml e 2 mg/ml. Da quanto esposto, appare importante segnalare la comparsa di ceppi MRSA con diminuita sensibilità alla vancomicina, anche in ambito veterinario. A questo fine si deve però considerare la difficoltà laboratoristica, sia con il test della diffusione in agar che con la MIC, nell'evidenziare la presenza di subpopolazioni a comportamento eterogeneo nei confronti della vancomicina (Appelbaum, 2007). Lo studio condotto ha costituito un primo approccio allo studio della sensibilità della vancomicina in ceppi MRSA da suino, che dovrà essere ampliato e valutato anche con altre tecniche.

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di valutare il pattern di antibiotico resistenza in ceppi di *S. aureus* isolati in suini clinicamente sani provenienti da 8 scrofaie considerate rappresentative per tipologia di allevamento e numero di animali allevati degli allevamenti da riproduzione delle regioni Friuli Venezia Giulia e Veneto. Le molecole scelte hanno permesso di effettuare valutazioni in merito alla resistenza ad alcune classi di chemioterapici. L'utilizzo della penicillina permette di avere informazioni sulla sensibilità del ceppo ad altri beta lattamici, mentre l'oxacillina e la cefoxitina consentono di evidenziare ceppi meticillino resistenti. Nel nostroa indagine, il 93% dei ceppi

presentano resistenza contemporaneamente alla penicillina, all'ampicillina e alla tetraciclina. P, e AMP sono ampiamente utilizzate nell'allevamento suino. Tra le sostanze ad azione antibatterica più utilizzate in miscela nei mangimi troviamo anche le tetracicline, utilizzate per la profilassi e il trattamento della rinite atrofica e delle malattie delle vie respiratorie profonde, spiegando in questo modo l'elevato pattern di antibiotico resistenza nei confronti di questa molecola. Inoltre, le differenze registrate in studi multicentrici condotti in diverse realtà produttive europee sottolineano l'importanza della conoscenza della prevalenza al fine di intraprendere adeguate strategie di controllo, alla tipologia di allevamento e alla prevalenza.
La resistenza agli antimicrobici nei batteri Gram positivi è un importante problema sia da un punto di vista terapeutico sia per le implicazioni di sanità pubblica. In particolare in ambito veterinario le segnalazioni di resistenze in diverse specie del genere *Staphylococcus* richiedono attenzione. Le recenti segnalazioni in Europa di isolamenti di Staphylococcus intermedius meticillino-resistente (MRSI) "mecA positivo" a partire da tamponi cutanei di cani e gatti evidenzia l'importanza dell'attenzione che deve essere data allo studio dell'antibiotico resistenza negli animali da reddito e da compagnia (Meucci, V. et al., 2010). La trasmissione all'uomo da animali d'affezione, inoltre, è stata dimostrata in Olanda.
Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici dei microrganismi patogeni e dei commensali costituisce un passo importante che influenza sia l'approccio terapeutico che gli interventi da attuare per un uso appropriato degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

Appelbaum, P.C. (2007). "Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-ressitant Staphylococcus aureus (MRSA). Int J Ant Agents. 30: 398-408.

Baba K., Ishihara K., Ozawa M., Usui M., Hiki M., Tamura Y., and Asai T. "Prevalence and mechanism of antimicrobial resitance in Staphylococcus aureus isolates from diseased cattle, swine and chicken in Japan". J Vet Med Science. Accepted date: 26 nov 2011

Bengtsson B., Unnerstad HE., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Ost M., Waller KP. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. 136. 142-149.

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). M31-A3. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Vol 28. n 8.

EFSA (2009).Valutazione della rilevanza per la salute pubblica di Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) negli animali e negli alimenti doi:10.2903/j.efsa.2009.993

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

Foster T.J. (2004).The *Staphylococcus aureus* superbug. *Clin Invest*. Dec;114 (12):1693-1696

Lewis C.H., Molbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau m., Sorum M., and Skov R.L. (2008) Pigs as a source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 infections in humans, Denmark. Emerging Infectious Diseases.14:1383-1389.

Meucci V, Vanni M, Guardabassi L, Moodley A, Soldani G, Intorre L. (2010). Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. Vet Res Commun. 34 Suppl 1:S79-82.

Rice L.B. (2006). Antimicrobial resitance in gram-positive bacteria". Am J Infect Control. 34:S11-9.

Rubin J.E., Ball K.R., Chirino-Trejo M. 2011. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudointermedius isolated from various animals. Can Vet J. 52: 153-157.

Vanderhaeghen W., et al., Methicillin ressitnat Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet Microbiol (2010), doi: 10.1016/j.vet-mic.2009.12.044

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLA COLONIZZAZIONE DA *Staphylococcus aureus* METICILLINO RESISTENTI (MRSA) NELL'ALLEVAMENTO SUINO

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON METHICILLIN-RESISTANT Staphylococcus aureus (MRSA) COLONIZATION IN PIG FARMING

GALLETTI E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombradia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA), colonizzazione, allevamento suino
Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), colonization, pig farming

Riassunto
Staphylococcus aureus meticillino resistente (MRSA) rappresenta un importante problema di Sanità Pubblica. E' stata dimostrata l'ampia diffusione a livello mondiale di MRSA nell'allevamento suino e come il suino sia implicato nella trasmissione del batterio all'uomo. Tuttavia poche sono le informazioni riguardanti il ruolo dell'ambiente nella diffusione del patogeno, il potenziale ruolo svolto dai prodotti alimentari nella diffusione di MRSA di origine animale e la dinamica della colonizzazione in allevamento.
Nel presente lavoro sono riportati i risultati di tre differenti studi condotti in allevamento e al macello. Nel primo studio la valutazione della contaminazione ambientale nelle diverse fasi di allevamento prima e dopo pulizia dimostra che pur essendovi una differenza significativa tra i locali alla fine della fase di produzione (50,4% di campioni positivi) rispetto agli stessi locali puliti e disinfettati (19% dei campioni positivi), tali operazioni sono inadeguate per una completa eliminazione di MRSA. I risultati migliori sono stati ottenuti nelle sale parto dove tali procedure sono più accurate.
Il secondo studio ha evidenziato che alla fine della catena di macellazione la contaminazione di carcasse di animali, provenienti da allevamenti positivi per MRSA, è frequente con un range di campioni positivi del 20%-60%. Uno studio longitudinale, infine, ha dimostrato che la percentuale di soggetti positivi in allevamento è correlato all'età degli animali e che la fase critica per la colonizzazione dei suini si trova tra la quarta e l'undicesima settimana di vita.

Summary
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) represents a major problem for the Public Health. Several Authors demonstrated the role of pigs as reservoirs of MRSA for human infection. Currently MRSA ha been identified in pigs in France, the Netherlands, Denmark, Singapore and Italy but little is known about the role of the environment in the spread of MRSA, the potential risk of contaminated food by MRSA and the age-related changes in MRSA colonization in pigs.
In this study, data collected from three studies conducted in pig herds and at the slaughterhouse are presented. In the first study the evaluation of the environmental presence of MRSA before (in the presence of animals) and after cleaning and disinfection from colonized herds, showed that 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. The second study conducted at the abattoir demonstrated that the MRSA contamination of pig carcasses from naturally colonized herds, at the end of the slaughter line is quite frequent. Finally, the longitudinal study in a pig farm showed that the percentage of MRSA positive animals is related to the age of the pigs (pigs colonization at 4th-11th weeks after birth).

INTRODUZIONE

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) è un batterio Gram-positivo resistente a tutti gli antibiotici β-lattamici. Infezioni umane sono state descritte inizialmente a livello ospedaliero a partire negli anni '70 mentre dagli anni '90 è stato osservata la diffusione di ceppi multiresistenti anche in soggetti non ospedalizzati, definiti come Community-acquired MRSA (CA-MRSA). Solo più recentemente, assieme all'incremento di infezioni umane causate da CA-MRSA, è stata evidenziata la colonizzazione da MRSA in diverse specie animali potenzialmente in grado di trasmettere il batterio all'uomo. 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 (van Rijen et al., 2007). In particulare, il *sequence type* chiamato ST398, frequentemente associate al suino, è emerso come un'importante causa di infezione da CA-MRSA in alcuni Paesi europei (van Rijen et al., 2008). Studi recenti hanno infatti documentato la trasmissione di MRSA tra suini ed operatori del settore suinicolo come veterinari, operai e loro famiglie (Voss et al., 2005; Huijsdens et al., 2006; Pan et al., 2009). In Italia è stata evidenziata colonizzazione nasale da MRSA nel 38% delle partite di suini macellati 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 un possibile veicolo di trasmissione di MRSA (The EFSA Journal, 2009).

Il presente studio, oggetto della tesi di Scuola di Specializzazione in "Ispezione degli Alimenti di Origine Animale" (Galletti, 2011), riporta i risultati di indagini condotte presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Bologna. I dati si riferiscono a tre studi svolti in allevamenti suini della Lombardia e dell'Emilia Romagna e al macello, che hanno avuto lo scopo di determinare la persistenza di MRSA, 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. Uno studio longitudinale è stato condotto in un allevamento della provincia di Modena, attraverso la raccolta di tamponi nasali effettuati su suini monitorati dalla nascita fino alla macellazione al fine di approfondire l'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle diverse classi di età e i potenziali effetti della tipologia di allevamento. L'identificazione della dinamica della colonizzazione da parte di MRSA, infatti, è un passaggio fondamentale per comprendere la trasmissione di questi batteri e per lo sviluppo di pratiche per il loro controllo.

MATERIALI E METODI

Studio 1:

Gli allevamenti sono stati arruolati in base ad un'analisi preliminare che aveva evidenziato la loro colonizzazione per MRSA. In totale sono stati considerati 6 allevamenti, 2 della provincia di Modena, 2 della provincia di Mantova, 1 della provincia di Verona e 1 della provincia di Brescia.

Nella tabella di seguito sono riportate le caratteristiche di ciascun allevamento insieme alle procedure di pulizia e sanificazione.

ID Allev.	n. scrofe	n. siti produzione	Tutto pieno -tutto vuoto	Rimozione materia organica	Uso detergenti	Lavaggio ad alta pressione	Uso di disinfettanti	Tempo di vuoto tra i gruppi
1	1.000	3	SI (completo in tutte le fasi)	SI	SI	SI (acqua calda in sala parto e svezzamento)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	7 giorni
2	900	3	SI (completo in sala parto e svezzamento incompleto in magronaggio e ingrasso)	SI	SI	SI (acqua calda solo in sala parto)	Alchilammine	2 giorni in gabbie parto e svezzamento 5 giorni in magronaggio e ingrasso
3	2.000	2	SI (completo in tutte le fasi)	SI	Solo in gabbie parto	SI (acqua fredda in tutti i reparti)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	1-3 giorni
4	1.000	1	Vedi allev. n. 2	SI	SI	SI (acqua calda in tutti i reparti)	alchilammine e sali quaternari d'ammonio	2 giorni
5	1.500	2	Vedi allev. n. 2	SI	SI	SI (acqua calda in tutti i reparti)	glutaraldeide e sali quaternari d'ammonio	2 giorni
6	1.550	2	SI (completo in tutte le fasi)	SI	Solo in gabbie parto	SI (acqua calda in tutti i reparti)	Perossidi inorganici + acidi organici + detergente anionico	4 giorni

Tab. 1: Caratteristiche degli allevamenti
Tab. 1: Herds characteristics

Campioni di polvere sono stati raccolti nelle gabbie parto, nei box di svezzamento e nei locali di magronaggio e ingrasso tramite l'utilizzo di garze sterili (Sodibox®) di circa 500 cm^2. In ogni fase di produzione sono stati raccolti 10 campioni alla fine di ogni fase, ovvero in presenza di animali e in ambiente sporco, e 10 dopo le operazioni di pulizia e sanificazione, prima dell'introduzione di nuovi animali. Per ciascun allevamento sono stati raccolti 80 campioni ambientali per un totale di 480 campioni. L'età degli animali nelle diverse fasi di accrescimento erano comprese tra 0-28 giorni nelle sale parto, 24-75 giorni nello svezzamento, 65-120 giorni nel magronaggio e 110-280 giorni nell'ingrasso.

Studio 2:
La valutazione sulla presenza di MRSA sulle carcasse a fine macellazione è stata eseguita su 5 partite provenienti da 3 dei sei allevamenti precedenti (allevamenti 1, 2 e 3) e da due allevamenti di cui sono tuttora in corso le indagini in allevamento (allevamenti 7 e 8). Un allevamento si trova nella provincia di Modena e 4 nella provincia 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.

Studio 3:
Lo studio si è svolto in un allevamento a ciclo chiuso della provincia di Modena (allevamento 6 tab.1) precedentemente identificato come colonizzato da MRSA. L'allevamento è suddiviso in due siti. Nel sito 1 sono presenti 1550 scrofe e i suinetti in svezzamento, nel sito due sono presenti i locali di messa a terra ed ingrasso. 30 scrofe di diverso numero di parti sono state sottoposte a tampone nasale al 80° giorno di gestazione. Dagli stessi animali è stato prelevato un campione cutaneo tramite strofinamento della mammella con garze sterili (Sodibox®) 3 giorni dopo il parto. 10 suinetti di 6 scrofe (5 scrofe scelte a caso e l'unica risultata colonizzata al primo prelievo) sono stati marcati individualmente con marca auricolare e sottoposti a tampone nasale secondo la seguente tempistica: tre giorni dalla nascita; un giorno prima dello svezzamento (giorno 27); fine svezzamento (giorno 75); inizio ingrasso (giorno 120); metà ingrasso (giorno 180); macellazione dopo iugulazione (giorno 270). Inoltre, attraverso l'uso dei Sodibox® sono stati raccolti 30 campioni ambientali dalla sala gestazione in presenza delle scrofe e 10 campioni rispettivamente dalla sala parto, locali svezzamento, messa a terra e ingrasso. I campionamenti ambientali sono avvenuti negli ambienti pieni (presenza di animali) e vuoti (locali puliti e sanificati in assenza di animali) seguendo il percorso degli animali marcati durante il loro ciclo di crescita.

Procedure di laboratorio
I campioni raccolti durante i tre studi sono stati sottoposti alle seguenti procedure di laboratorio. I tamponi nasali prelevati al macello sono stati raggruppati in 6 pool da 10 per ogni partita. I campioni ambientali dei tre studi ed i tamponi nasali dello 3 sono stati invece 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 Triptone 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 Resistence Screen Agar (Oxoid,UK), 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
Per lo studio 1 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 χ^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

Studio 1:

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%.

Nella figura 1 sono riportati i dati di positività considerando tutti i campioni positivi dei sei allevamenti, con la separazione tra locali pieni (sporchi) e locali vuoti (puliti).

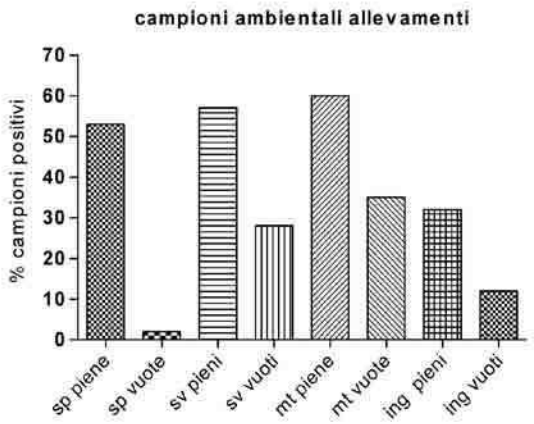


Grafico 1: percentuali di positività nei locali pieni e vuoti (**sp**: sala parto piena/vuota; **sv**: sala svezzamento piena/vuota; **mt**: locali messa a terra pieni/vuoti; **ing**: locali ingrasso pieni/vuoti).

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 emerge tuttavia dall'analisi nei vari reparti. Infatti, la probabilità di osservare un campione contaminato da MRSA nella 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 (Tabella 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

Tabella 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.
Table 1: Odds ratio of room with animal inside *vs* cleaned room for the probability of detection MRSA positive enviromental samples

Nelle fasi di produzione 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 di 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 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.

Studio 2:
Per quanto riguarda i tamponi nasali raccolti dopo iugulazione, 6 pool (100%) sono risultati positivi in quattro 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), 60 % (allevamento 7) e 55% (allevamento 8).

Studio 3:
Dall'analisi dei tamponi nasali effettuati sulle scrofe, solo un animale è risultato positivo per MRSA. La raccolta di Sodibox® a livello della cute della mammella ha dato esito negativo per tutte le scrofe.
La ricerca di MRSA nei tamponi nasali effettuati nei suinetti di tre giorni ha evidenziato la positività di 1 solo soggetto (1,7%). Tale soggetto non apparteneva alla nidiata della scrofa risultata positiva per MRSA dal tampone nasale.
I tamponi del 27° giorno di età sono risultati tutti negativi, mentre, nelle fasi successive (alla fine del periodo di svezzamento e all'inizio dell'ingrasso) tutti i tamponi nasali dei suini si sono

dimostrati positivi per MRSA (75° e 120° giorno). Dopo 6 mesi dalla nascita (metà ingrasso, 180° giorno) i campioni positivi sono risultati 11 (18,3%). Al momento della macellazione su 59 campioni, 14 sono risultati positivi per MRSA (23,7%) (Grafico 2).

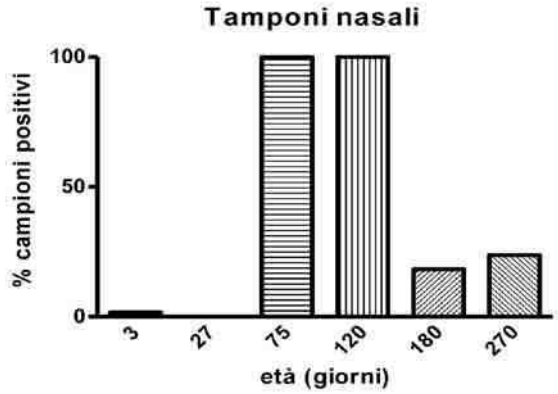


Grafico 2: Percentuali di positività dei tamponi nasali nelle diverse fasi di accrescimento
Graph. 2: Percentage of positive nasal swabs in the different phases

Per quanto riguarda la ricerca di MRSA nell'ambiente non sono stati riscontrati campioni positivi né a livello della sala gestazione, né nelle sale parto piene, né in quelle pulite e sanificate. Nelle gabbie di svezzamento piene sono risultati positivi 5 Sodibox® su 10 (50%) ed in quelle vuote 4 su 10 (40%). Nella fase di messa a terra sono stati individuati 5 campioni positivi nei locali pieni (50%) e 2 nei locali vuoti (20%). Nell'ultima fase, quella di ingrasso, i campioni positivi sia degli ambienti pieni che di quelli vuoti sono risultati pari a 1 (10%) (Grafico 3).

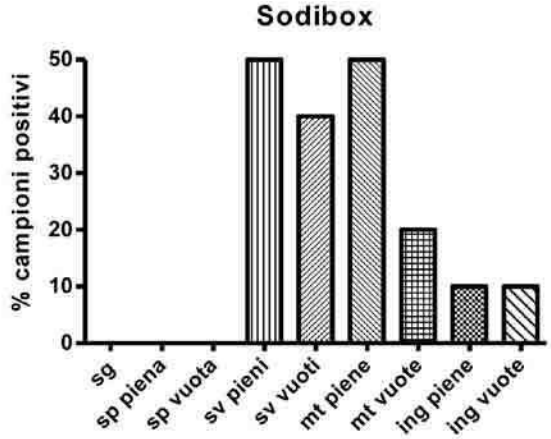


Grafico 3: Percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. **sp**: sala parto piena/vuota; **sv**: sala svezzamento piena/vuota; **mt**: locali messa a terra o pieni/vuoti; **ing**: locali ingrasso pieni/vuoti.
Graph. 3: Percentage of positive samples in units with or without animals. **sp:** farrowing unit populated/empty; **sv**: weaning unit populated /empty; **mt**: growing unit populated /empty; **ing**: finishing units populated /empty.

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 innanzitutto evidenziata una sostanziale differenza 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).

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 (de Boer et al., 2008; van Loo et al., 2007; Weese et al., 2010a); sono poche però le segnalazioni di infezioni causate dall'ingestione di cibi contaminati da MRSA (Jones et al., 2002; van Loo et al., 2007).

Lo studio longitudinale condotto in allevamento apporta informazioni originali riguardo all'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle varie fasi di età dei suini. Ad oggi, infatti, non vi sono lavori scientifici che prendano in considerazione periodi di monitoraggio così prolungati (9 mesi) e che, soprattutto, considerino sia la colonizzazione animale che la contaminazione degli ambienti in cui gli animali sono stabulati. Smith et al., (2009) hanno campionato, attraverso tamponi nasali, 209 suini di 7 diversi gruppi di età. A nove e 12 settimane di vita la percentuale dei tamponi positivi era del 100% per poi abbassarsi successivamente: 90%, 50%, 63%, 50% e 36% a 15, 18, 21, 24 settimane e in suini adulti. Weese et al., (2010b) con uno studio longitudinale che ha coinvolto sia le scrofe che i suinetti nella fase di pre-svezzamento e di post-svezzamento hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34.5%. In particolare ai giorni 1, 3, 7, 14 e 21 dopo la nascita la prevalenza dei suinetti era pari a 1%, 6,2%, 8,5%, 4,4% e 20%. Nella fase post-svezzamento la prevalenza totale era pari all'85% e pari al 34%, 65%, 50% e 42% rispettivamente ai giorni 28, 42, 56 e 70. Da questa indagine risulta inoltre che i suinetti nati da madri positive per MRSA a livello nasale nei giorni prima del parto o al momento del parto, presentano una probabilità maggiore di essere colonizzati. Tuttavia anche i suinetti nati da madri negative sono risultati positivi per MRSA nel corso dello studio. Nel presente studio non è stata osservata una correlazione tra la positività delle scrofe e quella dei suinetti; l'unico suinetto positivo nel primo campionamento (3 giorni dalla nascita) infatti è nato da una madre negativa per MRSA, mentre i suinetti nati dalla scrofa positiva sono risultati, in quel periodo di campionamento, negativi.

Nel corso dello studio è stato osservato un brusco innalzamento dei campioni positivi dei suini campionati alla fine dello svezzamento (100%). A circa 120 giorni dalla nascita (inizio ingrasso) i campioni positivi sono ancora il 100%, mentre alla fine dell'ingrasso (180° giorno) la prevalenza cala drasticamente passando al 18%, dato che viene praticamente confermato dal campionamento successivo (23%). L'andamento della prevalenza di MRSA nelle fasi di età, pur non essendo completamente sovrapponibile ai due lavori citati, è comunque paragonabile. Anche nella nostra indagine, infatti, sembra che la fase critica

per la colonizzazione sia tra la quarta e l'undicesima settimana di vita. In questo studio si è registrato un andamento analogo fra i tassi di positività dei campioni prelevati dagli animali e negli ambienti nelle diverse fasi di allevamento. Nel reparto gestazione e nelle sale parto non è stata evidenziata contaminazione ambientale e solo una scrofa su trenta è risultata colonizzata. Un suinetto su 60 è risultato colonizzato a 30 giorni di vita e nessuno su 60 alla fine del periodo sottoscrofa. Nel periodo successivo, nei locali di svezzamento, la prevalenza ha raggiunto il 100%. Il fatto che in tali locali, al momento dell'introduzione dei suinetti sia stata rilevata una contaminazione residua post-sanificazione, potrebbe essere alla base del netto aumento della prevalenza, suggerendo un ruolo importante dell'ambiente nel determinare la colonizzazione nasale nei soggetti naive. Nei locali di svezzamento e messa a terra si sono riscontrati i maggiori tassi di colonizzazione nasale e di campioni ambientali positivi. Nei reparti di ingrasso si assiste ad una diminuzione di entrambi i parametri. Resta da appurare con ulteriori studi se questa associazione possa essere estesa alla generalità degli allevamenti. Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può ipotizzare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente giochino un ruolo rilevante nella epidemiologia di MRSA. L'ipotesi che si può formulare sull'andamento della colonizzazione da MRSA è che questo dipenda sia da fattori ambientali ma anche da fattori che influiscono direttamente sull'animale come lo stress e l'adattamento alle diverse fasi e condizioni di allevamento.

CONCLUSIONI

L'analisi dei dati raccolti da apportato importanti informazioni sulla dinamica di colonizzazione da MRSA nell'allevamento suino. Nello specifico tali studi hanno evidenziato che: 1) all'interno degli allevamenti di suini colonizzati, la contaminazione ambientale da parte di MRSA è elevata e che le normali procedure di pulizia e disinfezione sembrano risultare per lo più inadeguate per una completa eliminazione di MRSA dai locali. 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. Un maggior rigore negli interventi di sanificazione potrebbe quindi 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. Questi risultati dimostrano anche una probabilità di campioni ambientali positivi (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.
2) 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 e, soprattutto, sarà interessante comparare da un punto di vista genetico i ceppi isolati durante i campionamenti in allevamento da quelli isolati al momento della macellazione.
3) Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può affermare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente giocano un ruolo fondamentale nella epidemiologia degli MRSA. L'ipotesi che si può formulare sull'andamento della colonizzazione da MRSA è che questo dipenda sia da fattori ambientali (procedure di pulizia e sanificazione) ma anche da fattori che influiscono direttamente sull'animale come lo stress e l'adattamento alle diverse condizioni di allevamento.

BIBLIOGRAFIA

Battisti A., Franco A. , Merialdi 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". Vet Microbiol. 2010 May 19;142(3-4):361-6

Brakstad O., Aasbakk K., Maeland J.A. (1992) "Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene". J. Clinic Microbiol. 30, 1654-1660.

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis J.T., Wit B. (2008) '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-Verheuvel 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.

Galletti E. (2011) "Indagine epedemiologica sulla colonizzazione da *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA) nell'allevamento suino". Tesi della Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, presso l'Università degli studi di Bologna, anno accademico 2010-2011, 1-55.

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-Verheuvel 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 methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy". Emerg. Infect. Dis, 15,845-847.

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission Assessment of the Public Health significance of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. (2009) The EFSA Journal. 993, 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 methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research". J. Med. Microbiol. 56, 1107-1109.

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) " Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestrn 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. Clinic Microbiol. 41, 4089-4094.

van Loo I.H.M., Diederen 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. (2007) "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands". Emerg. Infect. Dis. 13,1753-1755.

van Rijen M.M., Keulen P.V., Kluytmans J. (2008) Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming". Clinical Infectious Diseases 46, 261-263.
van Rijen M. M, Keulen P.V., Kluytmans J. (2007) "Increase of pig and calf MRSA in a Dutch hospital" Clin Microbiol Infect. 13, S446-S447.
Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005) "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming". Emerg. Infect. Dis. 11, 1965-1966.
Weese J.S., Zwambag A,. Rosendal T., Reid-Smiyh R., Frienship R. (2010a) "Longitudinal investigation on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets" Zoonoses and public health, 1-6.
Weese J.S., Reid-Smiyh R., Rousseau J., Avery B. (2010b) "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* contamination of retail pork" CVJ. 51, 749-752.

MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. *AVIUM*: FORME GENERALIZZATE DI TUBERCOLOSI AVIARE IN UN ALLEVAMENTO SUINO A GESTIONE MULTISITO

ASSOCIATION BETWEEN MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. AVIUM INFECTION AND GENERALIZED AVIAN TUBERCULOSIS IN A MULTISITE SWINE HERD

ZOPPI S. [1], GARRONE A. [1], ROSSI F. [1], FERRARO G. [1], SONA B. [2], GIORGI I. [1], GORIA M. [1], TRON S. [5], D'ERRICO V. [1], ALBORALI G. [4], ZANONI M.G. [4], DONDO A. [1], BARICCO G. [3]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; [2]Servizio Veterinario ASL CN1; [3]Veterinario Libero Professionista Torino; [4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia; [5]Servizio Veterinario ASL TO3

Parole chiave: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, distruzione della carcassa, allevamento multisito
Key Words: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, carcasses condemnation, multisite herd

Riassunto: L'infezione da *M. avium* subsp. *avium* (MAA) nel suino è spesso un problema sottovalutato, che può ripercuotersi sulla produzione, causando consistenti perdite economiche.
Viene descritto un focolaio di micobatteriosi aviare in un allevamento suino a gestione multi sito tra Aprile e Novembre 2011. La prevalenza di forme generalizzate in sede di macellazione si è rivelata superiore alla norma con picchi tra il 2% e il 3,7% per partita nei mesi di Agosto e Novembre, portando alla distruzione delle carcasse interessate. Le segnalazioni hanno coinvolto cinque siti d'ingrasso su dieci afferenti alla stessa scrofaia. Sono state condotte indagini sierologiche (30 scrofette, 30 primipare, 59 pluripare a fine carriera) e microbiologiche (10 suinetti sottoscrofa, 13 grassi). In particolare, sulle scrofe a fine carriera sono state eseguite aggiuntivamente la prova intradermica con PPD aviare e la macellazione. Gli esiti delle prove *in vita* (tubercolinizzazione e test ELISA) condotte suggeriscono una circolazione di MAA in tutti i settori della scrofaia. I test microbiologici hanno evidenziato positività per MAA sia nell'ingrasso, sia in lattazione. Tra i possibili interventi da attuarsi in sede di allevamento sono stati identificati: la selezione mediante esame sierologico (test ELISA) e microbiologico su feci (PCR) della rimonta e la modifica del protocollo di controllo delle parassitosi intestinali, che potrebbero favorire il passaggio di MAA attraverso la mucosa intestinale.

Abstract: *M. avium* subsp. *avium* (MAA) infection in swine is underestimated causing severe financial losses for retention at slaughter. An outbreak of avian mycobacteriosis in a multisite swine herd is here described. Between April and November 2011, the prevalence of generalized infection in slaughtered pigs was higher than usually reported, with peaks between 2% and 3,7%/stock in August and November, resulting in the condemnation of 44 swine carcasses. The infected pigs bred in five out of ten fattening herds linked with the same sow herd. Serological tests on 30 gilts, 30 first farrowing

sows, 59 replaced sows and microbiological tests on 10 piglets and 13 fattening pigs were performed. Tuberculinization and culling of replaced sows were added to the diagnostic protocol. *In vita* tests showed an active circulation of MAA in all of parts of the sow herd. Bacterial cultures confirmed the presence of MAA both in fattening and in piglets. Two corrective actions to face MAA infection and contain relative economic losses were suggested: test and slaughter policy in new gilts based on screening tests (ELISA and direct PCR on faeces) and revision of therapeutic protocol to control endoparasites, that could act as enhancer in MAA transfer trough the intestinal mucosa towards liver.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Mycobacterium avium* Complex (MAC) nell'allevamento suino è segnalato a livello internazionale (Thorel M.F. *et al*., 2001). L'importanza di questa patologia è principalmente determinata dalle perdite economiche dovuta allo scarto di organi o della carcassa *in toto* (Matlova L. *et al* , 2005; Alvarez J. *et al*, 2011) e dal suo potenziale zoonosico, in quanto riconosciuto come la più comune infezione batterica nei pazienti umani immunocompromessi (Falkinham J.O. III, 2009).

È tuttavia da ricordare che il cluster tassonomico MAC comprende specie e sottospecie batteriche con differenti gradi di patogenicità, spettro d'ospite e diffusione ambientale. Si tratta spesso di germi ubiquitari, rilevabili in riserve idriche, terreno, compost e prodotti alimentari (Matlova L. *et al*, 2005; Falkinham J.O., 2009). I principali reservoir sono i volatili ma si segnalano infezioni anche in altre specie animali, uomo compreso (Wellenberg G.J. *et al*, 2010; Johansen T.B. *et al*, 2010).

Grazie all'ausilio della biologia molecolare, nell'ambito dei MAC, è stato possibile dimostrare la grande variabilità dei ceppi differenziando sottospecie prima considerate sierotipi: *M. avium* subsp *sylvaticum*, *M. avium* subsp *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium* (MAA) e *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH).

MAA agente causale della tubercolosi aviare, è un patogeno stretto, di difficile riscontro al di fuori dell'organismo ospitante ma, pur trovando nei volatili gli ospiti di elezione, può infettare altre specie, tra cui suino e uomo. Solitamente l'infezione in specie diverse dai volatili si manifesta con lesioni a carico di singoli distretti linfonodali principalmente afferenti al tratto digerente ed è solitamente a carattere autolimitante (Hibiya K. *et al*, 2008).

MAH ha invece un ampio spettro d'ospite ed è considerato un patogeno opportunista largamente diffuso nell'ambiente. Gli stipiti appartenenti a MAH denotano una notevole variabilità dal punto di vista molecolare e sono di più frequente riscontro nelle patologie dell'uomo e del suino rispetto a MAA.

Sulla base di quanto riportato in bibliografia, ci è sembrato interessante segnalare questo focolaio riconducibile a MAA insolitamente di particolare gravità per il consistente e costante riscontro di forme di generalizzazione in un allevamento suino. Sono state pertanto studiate le possibili relazioni casuali servendosi di valutazioni anamnestiche e tecniche di laboratorio di tipo microbiologico e biomolecolare, con il fine ultimo di programmare un intervento atto a controllare il problema e ridurre le perdite in fase di macellazione.

MATERIALI E METODI

Allevamento e Animali

L'oggetto dello studio è un allevamento a ciclo aperto a gestione multisito (Figura 1), con annesso mangimificio, che provvede all'alimentazione di tutti i settori produttivi

(scrofaia, post-svezzamento e ingrasso). Si distinguono: scrofaia (circa 2800 scrofe di cui 600 primipare e 2200 pluripare, con 60000 svezzati all'anno), due siti di post-svezzamento (SITO 2) e 9 siti di ingrasso. L'età di macellazione è compresa tra i 9 e 10 mesi.

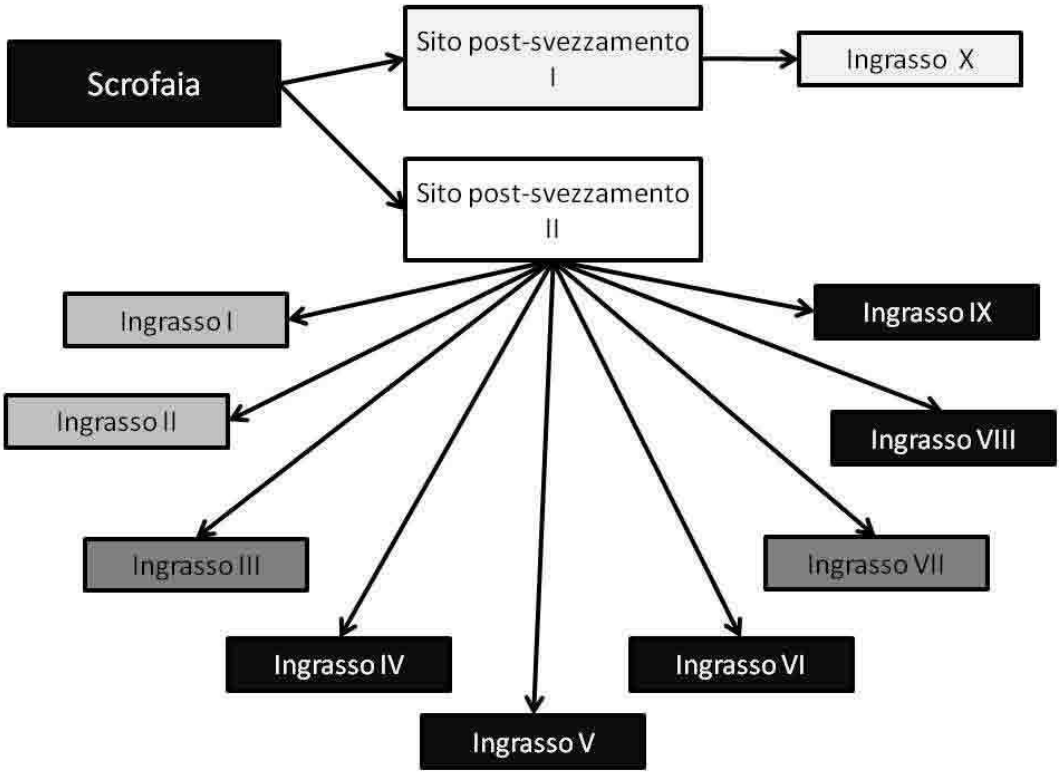


Figura 1: Rappresentazione grafica della gestione dell'allevamento. Le differenti gradazioni di grigio indicano il comune di ubicazione dei capannoni: colore uguale corrisponde a stesso comune di appartenenza. Come si può notare, nel comune della scrofaia sono presenti cinque dei dieci siti di ingrasso.
Figure 1: Graphic representation of herd management. Variation in grey scales corresponds in different location of finishing sites; the same colour indicates that finishing sites are placed in the same area. For example, sow herd is located nearby five different finishing sites (IV, V, VI, VIII and IX). Farrowing sites are placed away from sow herd.

Lo studio ha avuto inizio dalla distruzione al macello di 3 carcasse su una partita di 135 capi (14° settimana) perché presentavano lesioni generalizzate riconducibili a tubercolosi aviare. L'allevamento è stato così monitorato nel periodo successivo dalla 15° settimana alla 46° settimana (Tabella 1).

settimana	mese	sito ingrasso	capi distrutti	totale macellati 1/4-23/11	capi/ partita	capi positivi partita (%)	capi positivi macellati per sito ingrasso (%)
14	Aprile	VIII	3	2772	135	2,2%	0,1%
29	Luglio	X	1	5827	135	0,7%	0,0%
33	Agosto	X	9	(5827)	405	2,2%	0,2%
33	Agosto	IX	2	1808	135	1,5%	0,1%
33	Agosto	V	10	5109	270	3,7%	0,2%
35	Agosto	IV	3	1932	140	2,1%	0,2%
35	Agosto	X	5	(5827)	135	3,7%	0,1%
45	Novembre	X	3	(5827)	405	0,7%	0,1%
46	Novembre	X	8	(5827)	405	2,0%	0,1%
	TOTALE		**44**	**17448**	**2165**	**2,0%**	**0,3%**

Tabella 1: dettaglio dei capi macellati per sito d'ingrasso e capi distrutti. La percentuale di capi distrutti è stata calcolata sulla partita inviata al macello e sul totale degli animali prodotti dai singoli centri d'ingrasso oggetto di segnalazione.
Table 1: list of slaughtered swine subdivided according to finishing herd and condemnated carcasses. The percentage of condemnation is calculated considering single stock and the amount of stocks coming from the same finishing herd.

Dal primo riscontro di lesioni generalizzate (Aprile), è stato incrementato il controllo e la registrazione di lesioni granulomatose sospette su capi provenienti dai centri di ingrasso efferenti dalla stessa scrofaia. Successivamente alla conferma di tubercolosi aviare, sono stati programmati ulteriori esami di laboratorio da condursi in allevamento:

- Controllo sull'ingrasso, eseguendo la registrazione delle carcasse distrutte nel periodo successivo e prelievo in sede di macellazione degli organi sede di lesione
- Controllo dei nuovi nati, sacrificando e sottoponendo a controllo microbiologico 10 suinetti disvitali in modo randomizzato

- Controllo sul parco scrofe, eseguendo su 30 scrofette, 30 primipare e 59 scrofe a fine carriera un test ELISA specifico per la ricerca di anticorpi verso *M. avium*. Le scrofe a fine carriera sono state inoltre sottoposte a test tubercolinico prima di essere avviate al macello con prelievo in tale sede di organi bersaglio (fegato, linfonodi della testa, linfonodi meseraici e intestino retto), previa registrazione di eventuali lesioni sospette.

Anatomia patologica

Gli organi prelevati in sede di macellazione dei soggetti all'ingrasso e delle scrofe a fine carriera (polmoni, fegato, reni, linfonodi sottomandibolari e meseraici) e in sede autoptica sui suinetti disvitali sacrificati (fegato e milza) sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico.

Esame colturale per Micobatteri

I campioni rappresentati da pool di organi sono stati sottoposti ad esame colturale per *Mycobacterium* spp. I pool sono stati sminuzzati e omogeneizzati; l'omogenato è stato quindi suddiviso in aliquote sottoposte a due differenti metodi di decontaminazione con NaOH 2% e HPC 1.5% rispettivamente. Le aliquote decontaminate sono state seminate su una batteria di terreni all'uovo composta da Stonebrink, Lowenstein Jensen Medium, Lowenstein Jensen w/o glicerina ed incubate in termostato per un periodo di 60 giorni.
Le colonie isolate sono state sottoposte a estrazione del DNA tramite bollitura; l'identificazione e la tipizzazione molecolare (*Mycobacterium* spp, *M.* tb *complex*, *M. avium* e *M. tuberculosis*) è stata eseguita con Multiplex PCR, variazione "in house" dei metodi descritti da J.K. Kulski *et al*. (1995) e da K. Sinclair *et al*. (1995).
Le colonie classificate come *M. avium* sono state successivamente sottoposte ad analisi per la presenza della regione IS901 e della regione IS1245 per la differenziazione di sottospecie *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *hominissuis*. Sono state così allestite due simplex PCR mediate rispettivamente dai primers IS901-se (5'-GTGATCAAGCACCTTCGGAA-3') e IS901-pe (5'-GCTGCGAGTAGCTTGATGAG-3') secondo quanto descritto da Slana I. *et al*. (2010), e dai primers IS1245-P1 (5'-GCCGCCGAAACGATCTAC-3') e IS1245-P2 (5'-AGGTGCCGTCGAGGAAGAC-3') secondo quanto descritto da Guerrero C. *et al.* (1995).
I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di Agarosio (2%).

Campioni di siero

59 scrofe a fine carriera sono state sottoposte a test ELISA (soglia di prevalenza 5%) con un kit del commercio. Successivamente, è stato anche eseguito uno studio cross-sectional (soglia di prevalenza 10%), analizzando 30 scrofette e 30 primipare.

Intradermoreazione

59 scrofe a fine carriera sono state sottoposte a test tubercolinico. L'inoculo di 0,1 ml di derivato proteico purificato di *M. avium* (PPD aviare) è stato eseguito sulla faccia dorsale dell'orecchio destro. Le reazioni sono state lette a 72 ore post inoculo.

RISULTATI

Le distruzioni hanno coinvolto quattro siti su cinque di uno stesso comune e il sito d'ingrasso annesso al sito 2 di post-svezzamento, ubicato in un comune differente rispetto agli altri quattro allevamenti (Figura 2).

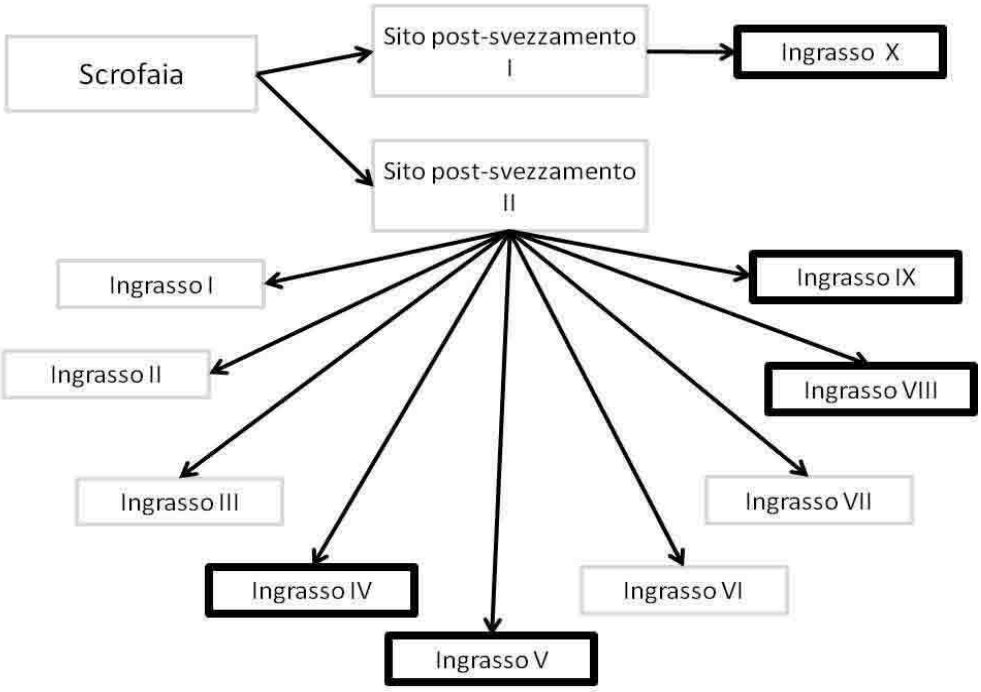


Figura 2: Rappresentazione schematica della distribuzione dei siti di allevamento. Le caselle bordate di nero indicano i siti di ingrasso oggetto di segnalazione al macello
Figure 2: Schematic representation of herd sites distribution. Black-bordered boxes are finishing sites with condemned carcasses

Categoria suini	n. animali controllati	POS SIT (%)	POS ELISA (%)	POS AP (%)	POS EB (%)
Rimonta	30	n.e.	4/30 (13%)	n.e.	n.e.
Primipare	30	n.e.	13/30 (43%)	n.e.	n.e.
Pluripare riformate	59	24/59 (41%)	54/59 (92%)	8/59 (14%)	n.e.
Suinetti	10	n.e.	n.e.	0/10 (-)	1/10 (1%)
Ingrasso	17448	n.e.	n.e.	n.d.	14/14 (100%)

Tabella 2: quadro complessivo dei riscontri analitici ottenuti nel periodo di studio (aprile/novembre 2011) e condotti sull'allevamento suino. [Esame tubercolinico: SIT; Esame anatomo-patologico: AP; Esame batteriologico: EB; Positività: POS; n.e.: non eseguito; n.d.: non determinabile]
***Table 2: analytical results of the study conducted between April and November 2011 in avian TB infected swine herd.* [Skin Intradermal Test: SIT; Anatomo-pathological test: AP; Bacteriological test: EB; Positivity: POS; n.e.: not done; n.d.: undefined]**

I test *in vita* hanno evidenziato la presenza dell'infezione in tutti i settori della scrofaia (Tabella 2).
Il quadro anatomo-patologico era sovrapponibile su tutti i suini destinati scartati alla macellazione: i linfonodi presentavano iperplasia diffusa ed aree necrotico-calcifiche a livello centrale (figura 3); i parenchimi epatico e polmonare (figura 4) erano diffusamente infiltrati da formazioni miliari di consistenza lardacea. In due casi sono stati riscontrati granulomi miliari diffusi a livello di parenchima renale, unitamente a sclerosi diffusa.
In sede di macellazione, sulle scrofe riformate sono state riscontrate lesioni compatibili esclusivamente a carico dei linfonodi della testa sottoforma di granulomi miliari necrotici.

Figura 3: linfonodo meseraico di suino, linfoadenite granulomatosa con focolai di necrosi caseosa e calcificazione.
Figure 3: fattening pig mesenteric lymphnode, granulomatous lymphadenitis characterized by multifocal caseous necrosis and calcification.

Figura 4: polmone di suino, polmonite granulomatosa miliare diffusa da *M. avium*.
Figure 4: fattening pig lung, severe and diffuse miliary granulomatous pneumonia due to M. avium.

Le colonie batteriche riferibili a *Mycobacterium* spp., mediante caratterizzazione molecolare, sono state identificate come *Mycobacterium avium* Complex (MAC) in tutti gli organi prelevati alla macellazione e in un suinetto.
Cinque ceppi di *M. avium* (Tabella 3) sono stati successivamente tipizzati come *M. avium* subsp. *avium*, per la presenza di entrambi gli elementi di inserzione IS901 e IS1245 (Guerrero C. *et al,* 1995).

Id. ceppo (settimana/mese/IZS/prot)	Sito	Tipizzazione
42/OTT PLV 105915	ingrasso X	MAA
SETT PLV 98105	suinetti	MAC
14/APR PLV 48841	ingrasso VIII	MAA
14/APR PLV 48851	ingrasso VIII	MAA
14/APR PLV 48858	ingrasso VIII	MAA
29/LUG PLV 78223	ingrasso X	MAA
33/AGO PLV 87544	ingrasso V	MAC
35/AGO LER 194116	ingrasso IV	MAC
35/AGO LER 194123	ingrasso IX	MAC
35/AGO LER 194942	ingrasso IV	MAC
33/AGO LER 197930	ingrasso X	MAC
33/AGO LER 197935	ingrasso X	MAC
35/AGO LER 197938	ingrasso X	MAC
35/AGO LER 197947	ingrasso X	MAC

Tabella 3: distribuzione dei ceppi di *M. avium* isolati e tipizzati valutando la presenza di entrambi gli elementi di inserzione IS901 e IS1245 [*M. avium* Complex: MAC; *M. avium* subsp. *avium*: MAA]
Table 3: distribution of M. avium strains typed according to the presence of insertion elements IS901 and IS1245 [M. avium Complex: MAC; M. avium subsp. avium: MAA]

DISCUSSIONE
La grande diffusione ambientale di MAC è talvolta un ostacolo all'individuazione della fonte di infezione. La raccolta di dati anamnestici ed uno studio epidemiologico per l'individuazione dei potenziali fattori di rischio presenti in azienda sono spesso l'unica via per risalire all'origine dell'evento morboso.
L'isolamento colturale dell'agente eziologico e la successiva caratterizzazione molecolare degli isolati clinici possono agevolare questo *iter* diagnostico integrato.
Come già descritto in letteratura, la frequente localizzazione a livello dei linfonodi meseraici e cervicali suggerisce come via di introduzione d'elezione quella alimentare (Hibiya K. *et al*, 2008; Wellenberg G.J. *et al*, 2010); anche nel caso qui descritto, la localizzazione delle lesioni suggerirebbe un'introduzione dell'infezione in azienda per via alimentare. Tuttavia, in questo studio, la percentuale di soggetti colpiti da forma generalizzata e provenienti

dal medesimo centro di riproduzione è risultata superiore all'1% (Alfredsen and Skjerve, 1993). Tale dato deporrebbe a favore di un episodio ben più grave rispetto ad una comune contaminazione per via alimentare del settore ingrasso, visto il coinvolgimento di più centri di ingrasso nello stesso arco temporale e il riscontro di positività batteriologica in un suinetto. Questo sosterrebbe l'ipotesi che l'infezione possa avvenire durante il periodo neonatale o nel periodo di lattazione. Inoltre, l'alta contaminazione ambientale, favorita dalla presenza di numerosi volatili nei pressi dell'allevamento e dalla presenza all'ingrasso di soggetti eliminatori non solo per via fecale, ma attraverso la meno frequente e insolita via urinaria, garantisce l'endemicità dell'infezione.
Secondo quanto riportato in bibliografia (Alfredsen and Skjerve, 1993) è stato osservato che, tra i fattori di rischio maggiormente implicati nel mantenimento dell'infezione, infatti, la presenza di un numero consistente di uccelli selvatici e sinantropi in prossimità dell'allevamento unitamente ad un sistema di ventilazione non adeguato (che obbliga a tenere le finestre aperte per favorire il ricambio di aria, e ridurre la concentrazione di ammoniaca) può favorire una maggiore contaminazione ambientale e una perpetuazione dell'infezione all'interno dell'allevamento. In aggiunta, patologie a carattere immunodepressivo, come la recente epidemia di PRRS verificatasi sia nella scrofaia che nell'ingrasso (Dicembre 2010) potrebbero aver favorito la comparsa di lesioni generalizzate nelle partite di luglio e agosto, ma non spiegherebbero la ricomparsa delle stesse nelle partite di novembre, in quanto i soggetti macellati in questo periodo provenivano da nidiate nate dopo l'epidemia di PRRS.

CONCLUSIONI

L'infezione da MAA nel suino è spesso un problema sottovalutato, anche perché fino a quando c'è equilibrio fra l'agente, l'ospite e l'ambiente, la manifestazione dell'infezione è quella classica del riscontro di lesioni granulomatose a carico dei linfonodi della testa. Nel momento in cui questo equilibrio si modifica, si creano le condizioni perché avvenga la generalizzazione della malattia, come presumibilmente è successo in questo allevamento. L'intensità riproduttiva tipica del moderno allevamento suino, ammettendo tra le possibilità anche la trasmissione per via congenita, è ovviamente un fattore di moltiplicazione dei fattori di rischio.
In considerazione di ciò, tra i possibili interventi da attuarsi in sede di allevamento, c'è l'intenzione di contenere e limitare i danni attuando una serie di interventi, quali

- Controllo sierologico e microbiologico su feci (PCR) della rimonta
- Modifica del protocollo di controllo delle parassitosi intestinali con passaggio da uno a due interventi nella fase di ingrasso, al fine di meglio prevenire un eventuale carry-over dell'infezione tubercolare per il tramite di larve di ascaridi oppure delle lesioni alla mucosa intestinale prodotte dalla infestazione da tricuridi.

Contrariamente a quanto si pensi, l'accanimento delle pratiche di disinfezione degli ambienti dovrebbe essere sostanzialmente evitata. Secondo alcuni autori (Taylor R.M. *et al*, 2000), infatti, le procedure di disinfezione tendono ad abbassare la flora microbica presente, ad eccezione dei micobatteri, creando così un habitat privo di competitor per MAC. Inoltre, l'utilizzo di disinfettanti a base di cloro è efficace esclusivamente a concentrazioni superiori a 1mg/l e a tempi di esposizione delle superfici da trattare superiori a due ore.
L'ipotesi di un trattamento antibiotico dei suinetti allo svezzamento è da considerarsi inutile e dispendioso sia perché l'infezione è già avvenuta in precedenza nella fase di lattazione (e il trattamento dell'infezione richiede l'utilizzo di più principi attivi per periodi prolungati), sia perché la lunga catena di acidi micolici della membrana esterna conferisce ai MAC idrofobicità, impermeabilità e lenta crescita, caratteristiche che contribuiscono alla

sopravvivenza del microrganismo attraverso la produzione di biofilm (Falkhinham J.O., 2009). Tuttavia, un trattamento individuale dei suinetti con un antibiotico specifico nei giorni immediatamente successivi al parto non è, allo stato delle cose, da escludersi a priori.
L'allevamento sarà oggetto di monitoraggio nel prossimo futuro, per valutare l'efficacia delle misure intraprese e l'evoluzione dell'infezione.

BIBLIOGRAFIA

Alfredsen S., Skjerve E. (1993) "An abattoir-based case-control study of risk factors for mycobacteriosis in Norwegian swine" Preventive Veterinary Medicine 15(4), 253–259

Falkinham J.O. III (2009) "Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment" Journal of Applied Microbiology 107, 356-367.

Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A. (1995) "A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness". J Clin Microbiol. 33(2), 304–307.

Hibiya K., Kasumi Y., Sugawara I., Fujita J. (2008) "Histopathological classification of systemic Mycobacterium avium complex infections in slaughtered domestic pigs". Comparative Immunology, Microbiology& Infectious Diseases (CIMI), 31, 347 – 366.

Johansen T.B., Agdestein A., Olsen I., Nilsen S.F., Gudmund Holstad G., Djønne1 B. (2010) "Biofilm formation by Mycobacterium avium isolates originating from humans, swine and birds". BMC Microbiol 9,159. doi:10.1186/1471-2180-9-159.

Kulski J.K., Khinsoe C., Pryce T., Christiansen K. (1995)"Use of a Multiplex PCR to detect and identify M. avium and M. intracellulare in blood culture fluid of AIDS patients" J. Clin. Microbiol. 33(8), 668-674.

Matlova L., Dvorska L., Ayele W.Y., Bartos M., Amemori T., Pavlik I. (2005) "Distribution of Mycobacterium avium complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement". Journal of Clinical Microbiology, 43, 261-1268.

Sinclair K., Challans J.A., Kazwala R.R., Hewinson R.G., Sharp J.M. "A multiplex polymerase chain reaction for distinguishing Mycobacterium tuberculosis from Mycobacterium tuberculosis complex" Mol Cell Probes 9(5), 291–295.

Slana I., Kaevska M., Kralik P., Horvathova A., Pavlik I. (2010) "Distribution of Mycobacterium avium subsp. avium and M. a. hominissuis in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR". Veterinary Microbiology 144, 437–448.

Taylor R.M., Norton C.D., Lechevallier M.W., Falkhinham J.O. III (2000) "Susceptibility of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum to chlorine, chloramines, chlorine dioxide, and ozone" Appl Environ Microbiol 66, 1702-1705.

Thorel M.F., Huchzermeyer H.F., Michel A.L. (2001) "Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare infection in mammals". Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20 (1):204-218.

Wellenberg G.J., de Haas P.E., van Ingen J., van Soolingen D., Visser I.J. (2010) "Multiple strains of Mycobacterium avium subspecies hominissuis infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs". Veterinary Record, 167, 451- 454.

STUDIO SULLA PREVALENZA DI *Brucella suis* NELLE POPOLAZIONI DI SUIDI DOMESTICI E SELVATICI DELL'UMBRIA

STUDY ON PREVALENCE OF *Brucella suis* INFECTION IN DOMESTIC PIGS AND WILD BOARS IN UMBRIA REGION

COSTARELLI S., MARESCA C., FACCENDA L., CROTTI S., TENTELLINI M., CUCCO L., PANZIERI C., MARIOTTI C., SENSI M., MAGISTRALI C.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche –Perugia

Parole chiave: *Brucella suis*, suini domestici e cinghiali
Key Words: *Brucella suis*, domestic pigs, wild boars

Riassunto

Da un punto di vista epidemiologico all'interno dei Paesi dell'unione europea la diffusione di *Brucella suis* risulta poco conosciuta. Nel tentativo di colmare, almeno in parte, l'assenza di informazioni sull'eventuale presenza e diffusione della B. *suis* nei suidi del nostro territorio abbiamo avviato un progetto di Ricerca i cui risultati preliminari vengono proposti in questo lavoro. Il progetto ha previsto controlli sierologici su popolazioni diverse di suidi della Regione Umbria. Sono stati controllati cinghiali selvatici abbattuti nel corso di tre stagioni venatorie (2009-2010- 2011), suini *outdoor* e suini di allevamenti intensivi. Sono stati effettuati controlli sierologici in siero agglutinazione rapida (SAR) e Fissazione del Complemento (FdC) in tutti gli animali. In caso di un titolo di FdC $\geq$ 20UISC/ml si è proceduto con l'isolamento batterico e la PCR. L'obiettivo è stato quello di effettuare una stima della prevalenza dell'infezione negli allevamenti suini umbri di tipo intensivo e *outdoor* e nei suidi selvatici. I risultati hanno evidenziato percentuali di siero prevalenza nei cinghiali selvatici abbattuti che oscillano tra 0,79% e 1,02% nei tre anni. In un animale è stata isolata *B. suis* Biovar 2. Sierologicamente negativi tutti i suini outdoor e quelli degli allevamenti intensivi. In conclusione, i cinghiali possono costituire una fonte di infezione di *B. suis* per l'uomo e per gli animali domestici in Umbria; di conseguenza si raccomanda un monitoraggio costante di questa infezione in questa categoria di suini.

Abstract

There is a lack of systematic epidemiological data on *Brucella suis* infection within the EU. In order to fill this gap, a project was carried out to gather information about the presence and diffusion of *B. suis* infection in Umbria Region in different population of pigs. Wild boars hunted during three different hunting seasons (2009-2010- 2011), outdoor reared pigs and pigs from intensive farming were tested for brucellosis by direct and indirect analysis, to evaluate the prevalence of *B. suis* infection in these different populations. In particular, all the animals were serologically tested using Rose Bengal Test and Complement Fixation Test (CFT). When international complement fixation test units (ICFTU) were equivalent to 20/mL or above, PCR and culture were also performed. The prevalence of *B. suis* infection in hunted wild boars ranges from 0,79 to 1,02 in the three years considered. Moreover, a strain of *B. suis* Biovar 2 was isolated from a wild boar. Outdoor reared pigs and pigs from intensive farming were serologically negative. In conclusion, wild boars can constitute a source of *B. suis* infection for man and domestic animals in Umbria; therefore, a continue monitoring of this infection in wild boars is recommended.

INTRODUZIONE

La brucellosi è una zoonosi diffusa in tutto il mondo (500.000 nuovi casi all'anno nel mondo), con valori di prevalenza ed incidenza che variano da paese a paese. Cinque sono le specie del genere *Brucella* causa di infezione negli animali domestici: *B. abortus* (infetta prevalentemente i bovini), *B. melitensis* (infetta prevalentemente gli ovini ed i caprini), B. *ovis* (causa di infezione negli arieti), *B. canis* (causa di infezione nel cane) e *B. suis*.

Delle 5 biovarianti di *B. suis* attualmente conosciute, le biovariante 4 e 5 riconoscono come ospiti abituali i ruminanti delle zone artiche, la biovariante 2 può infettare suidi e lepri, le biovarianti 1 e 3 hanno come ospiti naturali i suidi. In queste specie l'infezione *Brucella*e può decorrere in modo asintomatico ma, in alcuni casi, si possono manifestare anche forme cliniche per lo più ad andamento cronico (Anonimo, 2009c).

La biovariante 3 sembra essere presente in forma endemica soprattutto in Nordamerica e Cina Meridionale, la biovariante 2 è, invece, significativamente diffusa in Europa.

Nei suidi l'infezione da *B.suis* decorre spesso in forma asintomatica ma talvolta è possibile evidenziare una sintomatologia clinica caratterizzata da lesioni di tipo infiammatorio a carico dell'apparato riproduttore sia maschile che femminile e turbe riproduttive.

La principale, potenziale, fonte di infezione per i suini domestici è il cinghiale soprattutto nelle regioni europee in cui risulta diffuso l'allevamento suino all'aperto. In queste situazioni il contatto tra popolazione domestica allevata all'aperto e animale selvatico, oltre a rendere possibile la trasmissione dell'infezione tra le due popolazioni, rischia di alimentare la persistenza della diffusione brucellare nell'ambiente con il possibile coinvolgimento di altre specie domestiche animali e dell'uomo.

Indagini a carattere prevalentemente sierologico evidenziano la presenza di *B. suis* nei suidi selvatici in tutta Europa (Ruiz-Fons et al., 2006; Garin Bastuji et al., 2000; Garin Bastuji et al., 2001; Godfroid, 1994, Cvetnic et al., 2003; Hubalek et al., 2002) ma anche nelle popolazioni selvatiche di lepri dell'Est europeo (Anonimo, 2009c) che costituiscono anch'esse serbatoi naturali di questo agente infettante. In Italia, il Piemonte è stato una delle prime regioni in cui si siano attuati consistenti monitoraggi sierologici sulla popolazione dei cinghiali; oltre ad emergere elevate percentuali di sieropositività, sia in SAR sia in FdC, il 8,4% dei campioni esaminati batteriologicamente hanno evidenziato la presenza di *B. suis* biovar 1 e biovar 2 (Gennero et al., 2004). Altre indagini effettuate su diversi territori italiani hanno fatto evidenziare la presenza di *B. suis* nei cinghiali selvatici dell'Emilia Romagna (Rugna et al., 2011) e nei cinghiali e nei suini allevati della Sardegna (Alongi et al., 2008; Addis et al. 2010;).

Nel giugno 2009 a seguito di una richiesta da parte della Commissione Europea (DG Salute e Tutela dei Consumatori) è stato chiesto un parere sulla brucellosi suina al gruppo di esperti scientifici sulla salute e benessere degli animali (AHAW) (Question number: EFSA-Q-2008-665 Adopted: 05 June 2009 Published: 26 June 2009). All'interno dell'Ue la situazione epidemiologica è varia, alcuni paesi sembrano indenni alla malattia, altri hanno presentato focolai sporadici, altri segnalano l'infezione nei suidi come problematica emergente.

Non esistendo, al momento, alcun obbligo per il monitoraggio e la sorveglianza di *B.suis* nei suini domestici o selvatici c'è mancanza di dati epidemiologici sistematici nella maggior parte degli Stati membri. Ne deriva pertanto la necessità di approfondire le conoscenze sulla diffusione dell'infezione brucellare nelle specie selvatiche riconosciute come possibili *reservoir* e, possibilmente, nei suini domestici, soprattutto quelli allevati all'aperto.

Per questa ragione nel 2009 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche ha proposto un Progetto di Ricerca Corrente atto ad approfondire la situazione

epidemiologica della Brucellosi suina nelle regioni di sua competenza.
In particolare l'obiettivo è stato quello di effettuare una stima della prevalenza dell'infezione negli allevamenti suini umbri di tipo intensivo e *outdoor* e nei suidi selvatici, in Umbria.

MATERIALI E METODI
La popolazione oggetto del nostro studio è stata:

A. Cinghiali selvatici
B. Suini allevati a carattere intensivo e outdoor

A. Cinghiali selvatici:
Sono stati esaminati tutti i campioni appartenenti ad animali abbattuti in occasione di tre stagioni venatorie: 2009-2010, 2010-2011 e 2011-2012, ancora in corso. Allo scopo sono stati organizzati appositi incontri formativi con i responsabili degli ATC regionali ed i capisquadra venatori per illustrate le finalità del progetto e le modalità operative relative al prelievo di sangue e degli organi da effettuare al momento degli abbattimenti. Sulla base dei risultati sierologici ottenuti è stata calcolata la siero prevalenza basata su di una popolazione sconosciuta con i relativi intervalli di confidenza (I.C.) al 95%. (Altman *et ali,*2000)

B. Suini allevati:
Per valutare la siero prevalenza di allevamento sono stati realizzati due campionamenti casuali di tipo *random* con diversi parametri per le due popolazioni di suini umbre (*outdoor* e intensivo) valutando la popolazione specifica presente in banca dati nazionale il 30 ottobre 2011;

Per quanto riguarda gli allevamenti intensivi il monitoraggio sierologico è iniziato alla fine del 2011 ed è ancora in corso; ha riguardato aziende a ciclo aperto e a ciclo chiuso con un numero di capi >5. Sono stati esclusi gli ingrassi.
E' stato previsto un campionamento casuale semplice attribuendo a ciascuna ASL 30 allevamenti, tranne l'ASL 3 che ha campionato tutti gli allevamenti intensivi presenti nel suo territorio. In questo modo si è potuto calcolare la siero prevalenza con un livello di confidenza del 95%, una precisione del 6% ed una prevalenza ipotizzata del 50%.

Gli allevamenti intensivi del territorio regionale registrati in BDN al momento in cui è iniziato lo studio erano 165, cosi distribuiti:

Tabella 1: distribuzione degli allevamenti intensivi da campionare, in base alle ASL di appartenenza
Table 1: *distribution of theintensive herds to be sampled, according to the ASL competence*

	ASL 1	**ASL 2**	**ASL 3**	**ASL4**
N° allevamenti intensivi presenti	48	61	22	34
N° allevamenti da campionare	30	30	22	30

Anche per gli allevamenti *outdoor* il monitoraggio sierologico è iniziato alla fine del 2011 ed è ancora in corso. Sono state estratte 66 aziende considerando una prevalenza ipotizzata del 50%, una precisione del 10% ed un livello di confidenza (L.C.) del 95%. Gli allevamenti da campionare sono stati stratificati tra le varie AASSLL secondo lo schema seguente:

Tabella 2: distribuzione degli allevamenti out-door da campionare, in base alle ASL di appartenenza
Table 2: *distribution of the out-door herds to be sampled, according to the ASL competence*

	ASL 1	**ASL 2**	**ASL 3**	**ASL4**
N° allevamenti Outdoor presenti	9	47	63	98
N° allevamenti da campionare	3	15	17	31

All'interno di ogni allevamento il numero di capi soggetti a prelievo è stato lo stesso di quello previsto dal Piano di Sorveglianza della Malattia Vescicolare Suina, considerando una prevalenza attesa del 10% con un l.c. del 95%.
Tutti i sieri sono stati saggiati per brucellosi mediante Siero agglutinazione rapida al Rosa Bengala (SAR) e Fissazione del Complemento (FdC) (Manuale OIE, 2011). Sono stati considerati positivi alla fissazione i sieri con un titolo ≥ 20 UISC/ml.
In caso di positività alla SAR e Fissazione del Complemento o anche alla sola FdC si è proceduto all'isolamento batterico dagli organi e alla PCR.

L'esame batteriologico per *Brucella* è stato condotto sulla base di quanto indicato dal Manuale OIE (Anonimo, 2009°; Anonimo, 2009b). In breve, i campioni di tessuto sono stati frammentati mediante Stomacher in PBS (Phosphate Buffered Saline) in proporzione 1:9. Successivamente la sospensione è stata inoculata in Agar sangue e *Brucella* agar selettivo (Farrell's medium) e le piastre incubate a 37°C±1°C in aerobiosi e microaerofilia (8% CO2) per una settimana; 0,1 mL della sospensione sono state inoltre inoculate in 9 mL di *Brucella* Brodo selettivo (Farrell's broth) ed incubate a 37°C±1°C in microaerofilia (8% CO2). In seguito, in caso di negatività al colturale diretto, dalle colture in brodo sono state allestite subcolture settimanali in Agar Sangue e Agar *Brucella*, successivamente incubate a 37°C±1°C in microaerofilia (8% CO2). Per confermare la negatività, le subcolture sono state allestite per 6 settimane a partire dal momento dell'inoculo.

Le colonie con morfologia macro e microscopicamente riconducibile al genere *Brucella* sono state quindi sottoposte a PCR per identificazione di genere e specie secondo quanto descritto da Garcia Yoldi D. et. al. (2006), ed inviate per la conferma e l'identificazione del biovar al Centro di Referenza per la Brucellosi presso l'IZSAM, sede di Teramo.

L'analisi epidemiologica e statistica, possibile al momento soltanto per la popolazione di cinghiali selvatici controllata per tre anni consecutivi, ha considerato come "caso positivo" un animale il cui siero sia risultato ≥ 20 unità sensibilizzanti il complemento/ml (UISC/ml). La valutazione delle differenze tra le siero prevalenze degli anni 2010 e 2011 è stata effettuata tramite il test esatto di Fisher a due code considerando significativo un valore di $p \leq 0,05$.

RISULTATI
A. Cinghiali selvatici **:**
Il numero complessivo di cinghiali abbattuti e saggiati in Umbria nelle tre stagioni venatorie (2009-2011) ed i relativi risultati sono riportati nella Tab. 3 . Per quanto riguarda la Tab. 3 i capi positivi in FdC erano già positivi in SAR.

Tabella 3: N° di cinghiali saggiati durante le stagioni venatorie 2009-2011 in Umbria e relative positività

Table 3: *number of wild boars sampled in 2009-2011 hunting Seasons in Umbria and resulted positive for brucellosis*

	2009-2010	**2010-2011**	**2011-2012**	**Totale**
N° capi saggiati	341	379	501	1221
N° capi positivi SAR	24	36	11	71 (5,8%)
N° capi positivi in FdC	0	3	5	8 (0,6%)
N° capi positivi isolamento	0	1	0*	1 (0,08%)

* per 4 campioni l'esame batteriologico è ancora in corso

Per l'anno 2009, non essendoci stati sieri positivi tra i campioni esaminati, la sieroprevalenza nella popolazione di cinghiali è stata stimata pari allo 0,88% come massimo (l.c. 95%). Nel 2010 la sieroprevalenza è risultata dello 0,79% con intervalli di confidenza al 95% che oscillano tra lo 0, 20% ed il 2, 49%. Nel 2011 è risultata dello 1,02% con intervalli di confidenza al 95% che oscillano tra lo 0,37% ed il 2, 50%.
Le differenze tra le siero prevalenze riscontrate nel 2010 e nel 2011 non sono statisticamente significative.
L'unico campione risultato positivo all'esame batteriologico, tra i cinghiali selvatici della stagione di caccia, è stato un animale abbattuto nella stagione venatoria 2010-2011, nell'Area del Lago Trasimeno, di età superiore ai due anni, di sesso maschile. La reazione di siero agglutinazione rapida ha dato reazione immediata. La fissazione del complemento aveva un titolo pari a 106,6 UISC/ml. La milza, da cui sono state isolate le colonie di *Brucella suis*, presentava lesioni granulomatose diffuse, macroscopicamente evidenti. La PCR eseguita dalle colonie isolate ha permesso di identificare *Brucella suis*. Il ceppo batterico isolato è stato inviato presso il Centro di Referenza Nazionale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo che l'ha identificato come *Brucella suis* biovar 2.

B e C. Suini di allevamenti intensivi e *outdoor*:
Gli allevamenti suini *outdoor* testati sono stati 23, per un totale di 102 animali. Gli allevamenti a carattere intensivo testati sono stati 66 per un totale di 654 capi (Tab. 4).
Nessun suino è risultato positivo alla SAR, né alla Fissazione del Complemento.

Tabella 4: n° allevamenti e di suini domestici saggiati in Umbria dal 2011
Table 4: number of herds and domestic pigs tested in Umbria from 2011

	Suini allevamenti	
	OUTDOOR	**INTENSIVI**
N° ALLEVAMENTI SAGGIATI	23	66
N° ANIMALI SAGGIATI	102	654

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

A partire dagli anni ’90 la brucellosi sostenuta da B.*suis* è stata ripetutamente segnalata nelle popolazioni di cinghiali dell’Europa Centrale (Godfroid et al., 1994, 2002; Hars et al., 2000; Garin-Bastuji et al., 2000; Hubalek et al., 2002; Cvetnicet al., 2003; Godfroid and Kasbohrer, 2002). Isolamenti e sieropositività hanno interessato indifferentemente individui di diverse fasce d’età chiarendo come, nel cinghiale, l’infezione tenda a manifestarsi con patogenicità limitata, diversamente dal suino domestico. Nell’animale selvatico infatti la sintomatologia può essere anche inesistente mentre, nel suino, disturbi riproduttivi, aborti e mortalità neonatale si presentano con frequenza (Godfroid, 2002).

Se si fanno alcune eccezioni (Sud Est Asiatico, Sud America) in cui l’infezione sostenuta da *B. suis* nel suino domestico sembra essere molto diffusa, la sua prevalenza risulta limitata nei suini allevati della maggior parte del mondo. Tuttavia in alcune realtà europee il successo che ha avuto l’allevamento suino all’aperto, in alternativa alle tipologie tradizionali, sembrerebbe aver creato le condizioni per una possibile trasmissione dell’infezione dal selvatico al domestico. Non sembra casuale pertanto l’elevato numero di focolai di brucellosi in aziende di suini outdoor che si è registrato dal 1994 al 2001 (Garin-Bastuji et Hars, 2001).

In Italia la presenza di B. *suis* nei cinghiali è accertata da tempo in diverse regioni del territorio nazionale in cui le sieropositività registrate sono state seguite anche da isolamenti batterici (Gennero et al., 2004; Gennero et al., 2006); inoltre è stata segnalata la positività *Brucella suis* in suini allevati in Sardegna (Alongi et al., 2008; Addis et al., 2010)

I risultati della nostra ricerca sembrano confermare questi dati. In Umbria tuttavia le percentuali di positività sono molto basse (0,6% in FdC e 0,08% all’isolamento).

La *Brucella* isolata nel cinghiale abbattuto in Umbria è stata identificata come *B. suis* biovar 2, la cui patogenicità per l’uomo è scarsa. Tuttavia, eccezionalmente, sono stati segnalati casi di brucellosi umana sostenuta da *B. suis* biovar 2 (Teyssou et al., 1989; Paton et al., 2001). Al contrario *B. suis* bv 1 e bv 3 sono altamentente patogene. La patogenicità delle diverse specie di *Brucella* è generalmente specie-specifica ma non sono da escludere stabili adattamenti a specie diverse. E’ quanto si è verificato in Sud-America in cui *B. suis* bv 1 si è definitivamente adattata al bovino e nella stessa specie sono stati osservati casi di infezione sostenuta da *B. suis* bv 2 (Andersen and Pedersen, 1995; Godfroid et al., 2005).

La presenza di *Brucella suis* biovar 2 nella popolazione dei suidi selvatici in Umbria, se pure con livelli di prevalenza contenuti, si colloca in un contesto di diffusione endemica di questa infezione nei cinghiali presenti in Italia. Questo dato suggerisce di mantenere ed estendere l’attività di monitoraggio dell’infezione nelle popolazioni selvatiche suscettibili, per prevenire l’infezione nell’uomo ed in particolare nei cacciatori. Inoltre, la circolazione di *Brucella suis* rappresenta un rischio per le popolazioni domestiche in particolare nelle situazioni di contatto con le popolazioni selvatiche. Questa possibilità è particolarmente diffusa negli allevamenti *outdoor*, o nei piccoli allevamenti familiari tipici delle regioni Appenniniche dell’Italia centrale, come in Umbria. I dati raccolti nell’ambito della nostra ricerca non hanno evidenziato finora casi di infezione da B. *suis* in allevamenti intensivi e outdoor umbri, ci sembra tuttavia importante che gli operatori della filiera suina siano consapevoli del rischio e possano accedere ad informazioni epidemiologiche aggiornate, per consentire il contenimento dello stesso.

BIBLIOGRAFIA

Addis G., Cannata P., Deidda M., Cogoni M., Crobeddu S. Trincas M., Pilo C., Liardi M., Aloi D., Rolesu S. (2010) Sieroprevalenza di *Brucella* spp. in cinghiali catturati durante l'annata venatoria 2009-2010 nel sud della Sardegna. Atti del XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Genova, 27-29 ottobre 2010: 126-127.

Alongi C, Spazziani A, Zulato B, Deiana A, Frongia M, Orrù G, Liciardi M. (2008); "Isolamento di *Brucella suis* in allevamenti suini della Sardegna"; X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Altman D.G., Machin D., Bryant T.N. and Gardner M.J., (Eds) (2000) Statistics with Confidence, "nd edn, BMJ Books, London

Andersen, F. M., and K. B. Pedersen, 1995: Brucellosis. A case of natural infection of a cow with *Brucella suis* biotype 2. Dan. Vet. 78, 408.

Anonymous (2009a) Bovine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf

Anonymous (2009b) Porcine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf

Anonymous (2009c) Scientific opinion of the Panel on Animal health and Welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). The EFSA Journal 1144, 1-112

Cvetnic Z. *et al.* (2003) Wild boars (Sus scrofa) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. Acta Ve. Hung., 51: 465-473

Garin-Bastuji B., J. Hars, D. Calvez, M. Thiebaud, M. Artois (2000). Brucellose du porc domestiqueet du sanglier sauvagedue a *Brucella suis*biovar 2 en France. Med Mal Infect, 31 Suppl 2:202-216. Epidémiol. et santé anim., 2000, **38**, 1-5

Garin-Bastuji, B. and Delcueillerie, F. (2001). Les brucelloses humaine et ainmale en france en l'an 2000. Situation epidemiologique - programmes de controle et d'eradication. Med Mal Infect, 31 Suppl 2:202-216

B.Garin Bastuji and J. Hars (2001) Situation epidemiologique de la brucellose a *Brucella suis* Biovar 2 en France. Bulletin epidemiologique Afssa, 1/2001

Garcia-Yoldi D., Marin C.M., De Miguel P.M., Munoz P.M., Vizmanos J.L. & Lopez-Goni I. (2006) "Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella* abortus S19 and RB51 and *Brucella* melitensis Rev1"; Clin. Chem., 52, 779–781.

Gennero M. S., Grattarola C., Zoppi S., Di Giannatale E., Dondo A. (2004). "Brucellosis in wild boars in Piedmont Region". Epidemiologie et Sante´ Animale 45: 77–79.

Gennero M. S., Grattarola C., Bergagna S., Zoppi S., Barbaro A., E., Dondo A. (2006). "Trend of Brucella suiis infection in wild boar in Piedmont Region". Epidemiologie et Sante´ Animale 49: 59–62.

Godfroid, J., Michel, P., Uytterhaegen, L., Smedt, C. D., Rasseneur, F., Boelaert, F., Seagerman, C., and Patigny, X. (1994). Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (Sus scrofa) en Belgique. Ann. M_ed. V_et., 138:263-268.

Godfroid, J. and Kasbohrer, A.(2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Veterinary Microbiology, 90:135- 145.

Godfroid, J., A. Cloeckaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji, and J. J. Letesson, (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the

discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 36, 13–25.
Hars, J., M. Valery, F. Chaduc, B.Garin.Bastuji, O. Pinguet, and S. Rossi (2000). Surveillance de la Brucellose du sanglier et du lie`vre dans le de´partement de l'Allier. Bulletin d'Information sur la Pathologie des Animaux Sauvages en France 23: 121–138.
Hubalek, F. Treml, Z. Juricova, M. Hunady, J. Halouzka, V. Janik, D. Bill (2002) Serological survey of the wild boar (Sus scrofa) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. Vet. Med. – Czech, 47, 2002 (2–3): 60–66
Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M.L., Pongolini S., Sozzi E., Tamba M., Vicari N., Merialdi G. (2011) Monitoraggio sanitario della popolazione di cinghiali (Sus scrofa) in Emilia Romagna. Risultati degli anni 2006-2010. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento del Suino, XXXVII Meeting Annuale, Piacenza: 185-93.
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
Paton N.I., Tee N.W.S., Vu C.K.F., Teo T.P (2001) "Visceral Abscesses Due to *Brucella suis* Infection in a Retired Pig Farmer" *Clin Infect Dis.* (2001) 32 (8): e129-e130.
Teyssou R., Morvan J., Leleu J.P., Roumegou P., Goullin B., Carteron B. (1989): About a case of human brucellosis due to *Brucella suis* biovar 2. Méd. Mal. Infect., *19*, 160–161.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* F4+ ISOLATI DAL SUINO NEL PERIODO 2002-2011.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI F4+* STRAINS ISOLATED FROM SWINE IN THE YEARS FROM 2002 TO 2011

LUPPI A., BONILAURI P., GHERPELLI Y., MAIOLI G., BIASI G., DOTTORI M., MERIALDI G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Parole chiave: *Escherichia coli* F4+, antibiotico-resistenza, antibiogramma, Kirby Bauer
Key words: *Escherichia coli* F4+, antimicrobial-resistance, disk diffusion method, Kirby Bauer

Riassunto

Nel periodo 2002-2011 442 ceppi di *Escherichia coli* F4+ isolati da suini con diarrea, allevati in aziende ubicate nel Nord Italia, sono stati testati per la sensibilità a 13 antibiotici tramite antibiogramma. Attraverso un'analisi di regressione lineare, test ANOVA, è stato valutato il trend di sensibilità dei ceppi di *E.coli* agli antibatterici impiegati, considerando i risultati ottenuti da ogni antibiotico per ogni anno a confronto con quelli dell'anno precedente. I ceppi batterici hanno evidenziato, nell'intero periodo dello studio, un trend in diminuzione della sensibilità statisticamente significativo ($P<0.05$) nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), marbofloxacin (da 94,6% a 39,3%), flumequina (da 50,9% a 7,1%), danofloxacin (da 78,4% a 20%), aminosidina (da 54,6% a 28,6%), florfenicolo (da 90,2% a 35,7%) e cefquinome (da 96,2% a 56%). Una riduzione della sensibilità, statisticamente non significativa, è stata comunque osservata anche per gentamicina (da 36% a 14,3%), apramicina (da 38,2% a 17,9%), trimethoprim-sufametossazolo (da 25% a 10,7%), eritromicina (da 7,6% a 0%) e tetraciclina (da 2,6% a 0%). La colistina non ha fatto registrare variazioni significative (da 41,8% a 46,4%). I ceppi di *E.coli* F4+ sono stati suddivisi in tre classi sulla base della valutazione della multi-resistenza: I. ceppi resistenti a 2-5 antibiotici; II. ceppi resistenti a 6-10 antibiotici; III. ceppi resistenti a più di 10 antibiotici. Considerando l'intero periodo dello studio i ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza hanno evidenziato un decremento statisticamente significativo ($P<0.05$; R^2 0.96; r -0.97). Al contrario, i ceppi appartenenti alla seconda e terza classe di multi-resistenza hanno mostrato un incremento statisticamente significativo ($P<0.05$; R^2 0.86; r 0.92 e $P<0.05$; R^2 0.75; r 0.86 rispettivamente). I risultati del presente lavoro hanno evidenziato, nel periodo 2002-2011, un decremento statisticamente significativo della sensibilità antibiotica degli isolati di *E.coli* F4+ ed un incremento dei ceppi multi-resistenti appartenenti alle classi II e III.

Summary

Four-hundred forty-two F4+ pathogenic *Escherichia coli* were isolated, from 2002 to 2011, from pigs with diarrhea from Northern Italy swine herds. The strains were analyzed for their susceptibility to 13 antimicrobials by disk diffusion method. The trend of susceptibility of *E.coli* strains was determined using the linear regression analysis, test ANOVA. During the study observation period a statistically significant decreasing trend ($P<0.05$) in susceptibility was recorded for enrofloxacin (from 85,5% to 10,7%), marbofloxacin (from 94,6% to 39,3%), flumequine (from 50,9% to 7,1%), danofloxacin (from 78,4% to 20%), aminosidine (from

54,6% to 28,6%), florfenicol (from 90,2% to 35,7%), cefquinome (from 96,2% to 56%). A decrease in susceptibility (not statistically significant) was also observed for gentamicin (from 36% to 14,3%), apramycin (from 38,2% to 17,9%), trimethoprim-sulphametoxazolo (from 25% to 10,7%)%), tetracycline (from 2,6% to 0%) and erythromycin (from 7,6% to 0%), Susceptibility rate to colistin (from 41,8% to 46,4) did not change significantly over the study period. Based on antimicrobial multi-resistance, the strains were collected into three groups: I. resistant to 2-5 antimicrobials; II. resistant to 6-10 antimicrobials; III. resistant to > 10 antimicrobials. The number of isolates belonging to the first group showed a statistically significant decrease ($P<0.05$; R^2 0.96; r -0.97). Isolates belonging to the third and second groups showed a statistically significant increase ($P<0.05$; R^2 0.86; r 0.92 and $P<0.05$; R^2 0.75; r 0.86 respectively). A significant decrease in susceptibility to antimicrobials and an increasing of *E.coli* F4+ multi-resistant strains was observed from 2002 to 2011. This indicates the need for continued surveillance studies so that appropriate strategies can be developed to contrast the development of resistance in these and other pathogens.

INTRODUZIONE

L'incremento dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici patogeni e commensali di origine animale rappresenta uno dei temi di attualità sia in medicina veterinaria sia umana. Questo argomento è pertanto al centro delle preoccupazioni sanitarie sia nazionali sia sovranazionali e spesso, in modo più o meno opportuno, gran parte dell'attenzione è rivolta alla medicina veterinaria ed al ruolo della terapia antimicrobica nelle popolazioni animali nell'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. In questo contesto l'Unione Europea decise nel 1999 di vietare alcuni antibiotici promotori della crescita negli animali da reddito, contenenti principi attivi impiegati anche in medicina umana. A partire dal 1 gennaio 2006, infine, l'UE ha vietato l'utilizzo dei restanti antimicrobici utilizzati come promotori della crescita (reg. 1831/2003).

L'impiego degli antibiotici nell'allevamento suino, così come per altre specie allevate intensivamente, è uno strumento necessario per raggiungere standards produttivi ottimali ma ha come punto critico la possibilità che vengano selezionati ceppi batterici resistenti (Fairbrother et al., 2005). Inoltre, l'impiego irrazionale di farmaci antibatterici, sia in termini di frequenza sia di modalità d'impiego (ad esempio uso profilattico di certe molecole) ha costituito e costituisce tutt'ora un punto critico per l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Per la valutazione di questi ultimi *E.coli* può essere considerato un batterio marker, in quanto è in grado di acquisire resistenza nei confronti di numerosi antibatterici e pertanto può essere utilizzato come microrganismo indicatore sull'uso degli antimicrobici. Oltre a questo *E.coli* può comportarsi come reservoir di geni di antibiotico-resistenza, con la possibilità che questi possano essere trasferiti ad altri batteri patogeni per gli animali e per l'uomo e rappresentare quindi un punto chiave nella trasmissione orizzontale della resistenza (Burch, 2005).

Da un punto di vista pratico, infine, *E.coli* rappresenta uno dei patogeni più importanti nell'ambito della patologia suina, essendo responsabile di forme enteriche (diarrea neonatale e post-svezzamento), di gastroenteriti emorragiche, della malattia degli edemi e di fenomeni setticemici che sono alla base di gravi perdite economiche ed è quindi importante poter disporre di farmaci in grado di contrastare le infezioni e le forme cliniche precedentemente descritte.

In studi eseguiti in passato in Italia, riguardanti la sensibilità agli antibiotici di ceppi di *E.coli* isolati dal suino, emerge una certa variabilità nel tempo delle prevalenze di

sensibilità ai singoli principi attivi dei microrganismi testati (Barigazzi et al, 2001; Barigazzi et al., 2007). Questa tendenza è stata confermata da altri autori, con differenze talvolta significative tra paesi diversi (Yashpal et al., 2011).
Con il presente lavoro si è voluto indagare, attraverso uno studio retrospettivo, il tasso di sensibilità agli antibatterici, il trend di sensibilità ed il fenomeno della multi-resistenza dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati dal suino nel periodo 2002-2011.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Nel presente studio sono stati impiegati 442 ceppi di *E.coli* F4+ provenienti dall'attività diagnostica di routine della sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo gennaio 2002 – dicembre 2011. I ceppi batterici sono stati ottenuti dalla semina di materiale patologico prelevato da suini con patologia enterica ed appartenenti ad allevamenti ubicati nel Nord Italia. L'isolamento dei ceppi è stato eseguito su terreno colturale agar sangue, con incubazione in termostato a 37°C, ed identificazione tramite metodi biochimici e sierologici standard.

Sensibilità agli antibiotici

I ceppi di *E.coli* F4+ isolati sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 13 antibiotici: aminosidina (60 µg), apramicina (15 µg), cefquinome (10 µg), colistina (10 µg), danofloxacin (5 µg), enrofloxacin (5 µg), eritromicina (15 µg), florfenicolo (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), marbofloxacin (5 µg), tetraciclina (30 µg) e trimethoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg). L'antibiogramma secondo Kirby Bauer è stato eseguito seguendo un metodo di prova interno basato su standards noti (NCCLS, 2003 e 2004) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute (NCCLS, 2003 e 2004). Gli antibiogrammi hanno fornito pertanto, per ogni antibiotico impiegato, un risultato qualitativo espresso come "S, R o I" a seconda che il ceppo batterico in esame abbia mostrato rispettivamente sensibilità, resistenza o una condizione intermedia tra le prime due, ad una determinata molecola antibiotica.

Analisi statistica

Il tasso di sensibilità nei confronti di ciascun antibatterico è stato calcolato per ogni anno eseguendo il rapporto tra il numero di ceppi di *E.coli* F4+ sensibili e il numero totale di ceppi testati nei confronti di un determinato antibiotico. Attraverso un'analisi di regressione lineare, test ANOVA, è stato valutato il trend di sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *E.coli* impiegati nello studio, considerando come variabile dipendente la percentuale di ceppi sensibili e come variabile indipendente l'anno di isolamento. Le differenze sono state considerate significative con $P<0.05$.
I ceppi in esame sono stati inoltre suddivisi in tre classi di multi-resistenza antibiotica secondo lo schema riportato di seguito: classe I (ceppi resistenti a 2-5 antibiotici), classe II (ceppi resistenti a 6-10 antibiotici), classe III (ceppi resistenti a più di 10 antibiotici). Anche in questo caso attraverso un'analisi di regressione lineare, in cui è stata considerata come variabile dipendente la percentuale di ceppi multi-resistenti per ogni classe e come variabile indipendente l'anno di isolamento, è stata valutata la significatività del risultato ottenuto. Le differenze sono state considerate significative con $P<0.05$.

RISULTATI

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati ed il relativo trend dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati tra il 2002 ed il 2011 nei confronti di ogni antimicrobico impiegato sono riportati in tabella 1. Per completezza d'informazione, nelle tabelle 2 e 3 vengono riportati i dati relativi alle percentuali di ceppi intermedi e resistenti ai diversi antibiotici impiegati.

Tabella 1: Sensibilità antibiotica di 442 ceppi di *E.coli* F4+ isolati nel periodo 2002-2011 e valutazione statistica del trend (R^2 ed r = coefficienti della regressione).
Table 1: Susceptibility to selected antimicrobials of 442 *E.coli* F4+ isolated from swine during 2002-2011 and statistical analysis of observed variations (R^2 and r = regression coefficients).

	Anno d'isolamento – N° ceppi testati - % ceppi sensibili												
	2002	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**			
N° di ceppi testati	**55**	**53**	**63**	**45**	**68**	**39**	**44**	**18**	**29**	**28**	**Statistica**		
Antibiotico													
Fluorochinoloni											**P**	**R^2**	**r**
Enrofloxacin	85,5	74,6	88,9	57,8	60,3	53,9	34,1	50,0	27,6	10,7	**<0.05**	**0.87**	**0.93**
Marbofloxacin	94,6	83,3	92,1	68,9	61,8	61,5	50,0	61,1	37,9	39,3	**<0.05**	**0.88**	**0.94**
Flumequina	50,9	40,7	57,1	35,6	44,1	30,8	18,2	22,2	20,7	7,1	**<0.05**	**0.81**	**0.90**
Danofloxacin	78,4	77,8	87,3	55,6	60,3	64,9	33,3	50,0	20,7	20	**<0.05**	**0.81**	**0.90**
Aminoglicosidi													
Gentamicina	36,4	34,6	25,4	33,3	16,4	48,7	40,9	22,2	24,1	14,3	**>0.05**	**0.15**	**0.39**
Apramicina	38,2	25,5	22,2	42,2	19,1	35,9	31,8	16,7	10,3	17,9	**>0.05**	**0.33**	**0.57**
Aminosidina	54,6	60,4	50,8	42,2	38,2	51,3	43,2	42,9	37	28,6	**<0.05**	**0.67**	**0.82**
Amfenicoli													
Florfenicolo	90,2	83,3	93,7	66,7	80,9	76,9	56,8	44,4	20,7	35,7	**<0.05**	**0.80**	**0.89**
Macrolidi													
Eritromicina	7,6	0	7,9	0	0	5,1	6,8	0	0	0	-	-	-
Cefalosporine													
Cefquinome	96,2	98,2	90,5	95,6	89,7	84,6	78,1	77,8	51,7	56	**<0.05**	**0.82**	**0.90**
Altri													
Trimethoprim-Sulfametossazolo	25,0	37,0	15,9	4,4	16,2	18,0	29,6	5,6	41,4	10,7	**>0.05**	**0.01**	**0.1**
Tetraciclina	2,6	7,4	4,8	4,4	0	2,6	4,6	0	3,5	0	**>0.05**	**0.28**	**0.53**
Colistina	41,8	41,8	50,8	40,2	38,8	42,1	41,8	38,9	58,6	46,4	**>0.05**	**0.10**	**0.32**

Tabella 2: Percentuale di ceppi di *E.coli* F4+ risultati intermedi ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2002-2011.
Table 2: Percentage of *E.coli* F4+ strains resulted intermediate to selected antimicrobials from 2002 to 2011.

	% Isolati intermedi / Anno									
Antibiotico	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**
Fluorochinoloni										
Enrofloxacin	9,1	10,9	4,8	13,3	4,4	10,3	20,5	11,1	20,7	28,6
Marbofloxacin	0	0	1,6	2,2	4,4	0	11,4	11,1	13,8	10,7
Flumequina	28,3	42,6	25,4	28,9	22,1	30,8	29,6	27,8	10,3	42,9
Danofloxacin	7,8	5,6	4,8	13,3	5,9	0	33,3	5,6	13,8	0
Aminoglicosidi										
Gentamicina	16,4	9,1	15,9	11,1	17,9	2,6	20,5	22,2	20,7	32,1
Apramicina	7,3	9,1	4,8	0	1,5	2,6	0,0	0,0	10,3	0,0
Aminosidina	1,8	1,9	6,4	0	2,9	0	0,0	0,0	7,4	0,0
Amfenicoli										
Florfenicolo	7,8	13,0	4,8	26,7	7,4	12,8	9,1	22,2	17,2	14,3
Macrolidi										
Eritromicina	5,7	7,7	6,4	4,4	7,4	2,6	6,8	0	0	0
Cefalosporine										
Cefquinome	1,9	1,9	1,6	0	0	0	0	0	3,5	0
Altri										
Trimethoprim-Sulfametossazolo	0	3,7	0	2,2	0	2,6	0	0	0	0
Tetraciclina	2,6	0	0	0	0	0	0	0	3,5	3,6
Colistina	36,4	27,3	30,2	32,2	30,9	29,4	31,2	33,3	20,7	35,7

Tabella 3: Percentuale di ceppi di *E.coli* F4+ risultati resistenti ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2002-2011.
Table 3: Percentage of resistant *E.coli* F4+ strains to selected antimicrobials from 2002 to 2011.

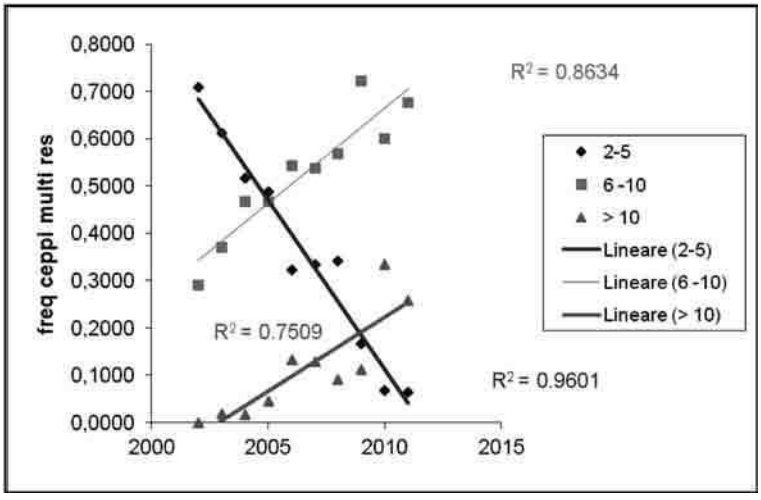
	% Isolati resistenti / Anno									
Antibiotico	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**
Fluorochinoloni										
Enrofloxacin	5.5	14.6	6.4	28.9	35.3	35.9	45.5	38.9	51.7	60.7
Marbofloxacin	5,5	16,7	6,4	28,9	33,8	38,5	38,6	27,8	48,3	50
Flumequina	20,8	16,7	17,5	35,6	33,8	38,5	52,3	50,0	69,0	50
Danofloxacin	13,7	16,7	7,9	31,1	33,8	35,1	33,3	44,4	65,5	80
Aminoglicosidi										
Gentamicina	47,3	56,4	58,7	55,6	65,7	48,7	38,6	55,6	55,2	53,6
Apramicina	54,6	65,5	73,0	57,8	79,4	61,5	68,2	83,3	79,3	82,1
Aminosidina	43,6	37,7	42,9	57,8	58,8	48,7	56,8	57,1	55,6	71,4
Amfenicoli										
Florfenicolo	2	3,7	1,6	6,7	11,8	10,3	34,1	33,3	62,1	50
Macrolidi										
Eritromicina	86,8	92,3	85,7	95,6	92,7	92,3	86,4	100	100	100
Cefalosporine										
Cefquinome	1,9	0	7,9	4,4	10,3	15,4	21,9	22,2	44,8	44
Altri										
Trimethoprim-Sulfametossazolo	75,0	59,3	84,1	93,3	83,8	79,5	70,5	94,4	58,6	89,3
Tetraciclina	94,7	92,6	95,2	95,6	100	97,4	95,5	100	93,1	96,4
Colistina	21,8	30,9	19,1	27,6	30,3	28,5	27	27,8	20,7	17,9

I ceppi batterici hanno evidenziato un trend di diminuzione della sensibilità statisticamente significativo nell'intero periodo dello studio, nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), marbofloxacin (da 94,6% a 39,3%), flumequina (da 50,9% a 7,1%), danofloxacin (da 78,4% a 20%), aminosidina (da 54,6% a 28,6%), florfenicolo (da 90,2% a 35,7%), cefquinome (da 96,2% a 56%). Un decremento della sensibilità, statisticamente non significativo, è stato osservato anche per la gentamicina (da 36% a 14,3%), l'apramicina (da 38,2% a 17,9%), il trimethoprim-sulfametossazolo (da 25% a 10,7%), l'eritromicina (da 7,5% a 0%) e la tetraciclina (da 2,5% a 0%). La colistina (da 41,8% a 46,4%) non ha fatto rilevare cambiamenti significativi nel periodo di 10 anni considerato.
I risultati ottenuti dalla suddivisione dei ceppi in tre classi di multi-resistenza sono riportati in tabella 4 e nel grafico 1.
Tutti i ceppi di *E.coli* F4+ inclusi nello studio sono risultati multi-resistenti, mostrando resistenza ad almeno due antibiotici. In particolare analizzando le percentuali dei ceppi appartenenti alle tre classi sopraccitate, in relazione all'anno d'isolamento, appaiono evidenti due scenari:
a) i ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza hanno evidenziato un decremento statisticamente significativo passando dal 70,9% nel 2002 al 6,5% nel 2011 (tabella 4).
b) i ceppi appartenenti alla seconda e terza classe di multi-resistenza hanno mostrato un incremento statisticamente significativo passando rispettivamente dal 29,1% nel 2002 al 67,7% nel 2011 e dallo 0% nel 2002 al 25,8% nel 2011 (tabella 4).

Tabella 4: Numero di ceppi espresso come percentuale sul totale di quelli testati per ogni anno, considerando l'appartenenza ad una delle tre classi di multi-resistenza (R^2 ed r = coefficienti della regressione).
Table 4: Percentage of resistant strains collected into three classes of multi-resistance (R^2 and r = regression coefficients).

		Classi di multi-resistenza		
Anno		**2 – 5**	**6 -10**	**>10**
2002		70,9%	29,1%	0%
2003		61,1%	37%	1,9%
2004		51,6%	46,8%	1,6%
2005		48,9%	46,7%	4,4%
2006		32,4%	54,4%	13,2%
2007		33,3%	53,9%	12,8%
2008		34,1%	56,8%	9,1%
2009		16,7%	72,2%	11,1%
2010		6,7%	60%	33,3%
2011		6,5%	67,7%	25,8%
Statistica	**P**	*p<0.05*	*p<0.05*	*p<0.05*
	R^2	0,9601	0,8634	0,7509
	r	-0,979847	0,929193	0,866545

Grafico 1: Espressione grafica della frequenza dei ceppi appartenenti alle tre classi di multi-resistenza e significatività statistica.
Figure 1: Frequency of strains belonging to the three classes of multi-resistance and statistical significance.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'impiego degli agenti antimicrobici, con conseguente pressione selettiva sulle popolazioni batteriche presenti nelle specie trattate, costituisce da una parte uno strumento irrinunciabile per la gestione sanitaria di animali allevati intensivamente e dall'altra un fattore di rischio per l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Analizzando i risultati ottenuti nel presente lavoro si osserva una diminuzione dell'attività della maggior parte degli antibatterici durante tutto il periodo dello studio (2002-2011).

Considerando i risultati delle singole classi anticorpali si evidenzia per i fluorochinoloni impiegati, un calo dell'attività durante tutto il periodo dello studio, dato che appare in accordo con i risultati ottenuti da Taylor et al. nel 2009. Nello studio di Taylor il 79% delle aziende che facevano uso di fluorochinoloni, su 108 arruolate, presentavano isolati di *E.coli* resistenti a queste molecole, contro il 19% di quelle che non ne facevano uso, sottolineando come l'impiego diffuso degli antimicrobici, rappresenti il principale fattore di rischio per l'insorgenza di fenomeni di resistenza.

Il trend di diminuzione di sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), osservato nel presente studio, appare in accordo con i risultati riportati da Mayrhofer et al. nel 2004 in Austria e discordanti con quelli presentati da Smith et al. nel 2009 in Australia e da Yashpal et al. nel 2011 in Canada. Fra i fluorochinoloni impiegati, la sensibilità nei confronti del marbofloxacin è risultata essere maggiore rispetto a quella osservata per enrofloxacin, flumequina e danofloxacin. Questo potrebbe riflettere una minor incidenza di fenomeni di cross-resistenza tra questi ultimi ed il marbofloxacin, così come descritto per altri patogeni batterici di origine animale ed umana (Vanni et al., 2011).

Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, tutte le molecole utilizzate nello studio hanno evidenziato un trend di diminuzione dell'attività, che tuttavia è risultata essere statisticamente significativo solo per l'aminosidina. Inoltre, eccezion fatta per la gentamicina, dove nel 2011 i ceppi appartenenti alle categorie intermedio e resistente sono stati rispettivamente il 32,1% e il 53,6%, per l'apramicina e l'aminosidina non sono stati riscontrati ceppi appartenenti alla prima categoria, mentre gli isolati resistenti sono risultati essere rispettivamente l'82,1% e il 71,4%. Fenomeni di cross-resistenza all'interno del gruppo degli aminoglicosidi sono stati ampiamente descritti, soprattutto per quel che riguarda la gentamicina e la neomicina (Mathew et al., 1999).

Il florfenicolo ha evidenziato nel periodo dello studio un trend di diminuzione dell'efficacia, ed i ceppi testati hanno presentato una riduzione della sensibilità, passando dal 90,2% nel 2002 al 35,7% nel 2011.

Il cefquinome ha manifestato un calo significativo dell'attività dal 2002 al 2011 passando rispettivamente da valori di sensibilità del 96,2% al 56%. Nonostante una riduzione dell'attività nel corso degli anni di entrambe le molecole, i ceppi di *E.coli* hanno mantenuto, nei confronti di queste, un livello di sensibilità tra i più alti se confrontati con i risultati degli altri antimicrobici impiegati nello studio.

Il thrimethoprim-sulfametossazolo ha manifestato una diminuzione percentuale dell'attività statisticamente non significativa ed un andamento altalenante durante tutto il periodo dello studio, passando da percentuali di sensibilità del 25% nel 2002, del 4,4% nel 2005, del 41,4% nel 2010 e del 10,7% nel 2011.

La tetraciclina e l'eritromicina hanno invece presentato bassi livelli di attività durante tutto il periodo considerato. I risultati ottenuti per il thrimethoprim-sulfametossazolo, la tetraciclina e l'eritromicina sono in accordo con i risultati presentati in studi condotti in altri paesi come Regno Unito, Canada e Spagna (Burch, 2005; Kozak et al., 2009 e Stannarius et al., 2000).

Nei confronti della colistina, i ceppi testati hanno manifestato una sensibilità costante in tutto

il periodo dello studio, senza evidenziare significative variazioni anche per quanto riguarda le percentuali di ceppi risultati intermedi e resistenti (Tab.1,2,3). Anche per la colistina, per la quale la percentuale di sensibilità registrata nel 2011 è stata del 46,4%, si conferma il ruolo primario nel trattamento per via orale delle infezioni gastroenteriche da *E.coli* nel suino.
Un risultato che merita una valutazione approfondita è l'aumento significativo, nel corso degli anni, dei ceppi caratterizzati da multi-resistenza nei confronti di un numero sempre maggiore di antimicrobici. Come descritto in tabella 4 il numero di ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza (2-5 antibiotici) ha evidenziato un marcato decremento durante l'intera durata dello studio. Questo ha visto parallelamente un progressivo incremento dei ceppi appartenenti alle classi II e III, che nel 2011 hanno raggiunto rispettivamente il 67,7% ed il 25,8%. Il fenomeno della multi-resistenza, secondo uno studio basato sull'analisi dei profili genetici di resistenza e virulenza di ceppi Australiani di *E.coli* ETEC, sarebbe da attribuire alla pressione selettiva perpetuatasi a livello di singolo allevamento piuttosto che alla selezione, prevalenza e diffusione laterale di particolari cloni multi-resistenti di *E.coli* (Smith et al., 2010). Tuttavia, se da una parte esiste una notevole variabilità genetica e del profilo di antibiotico-resistenza tra ceppi con origine diversa, è altrettanto vero che cloni batterici multi-resistenti possono facilmente essere veicolati attraverso lo spostamento di animali. A questo si aggiunga la possibilità che geni responsabili dell'antibiotico-resistenza possano esser trasferiti ad altri batteri patogeni, della stessa specie o anche di specie differenti, con trasmissione orizzontale della resistenza.
La diminuzione della sensibilità agli antibatterici dei ceppi di *E.coli* testati, osservata nel corso degli anni, costituisce senza dubbio un dato allarmante ma che deve essere valutato attentamente considerando la natura del campionamento praticato nel presente lavoro. E' necessario infatti sottolineare come la maggior parte del materiale patologico conferito presso il laboratorio provenga frequentemente da casi problematici e di difficile soluzione dal punto di vista terapeutico. Quanto appena esposto può essere alla base di una sovrastima del problema, che tuttavia non deve essere sottovalutato.
I risultati di questo lavoro hanno evidenziato un trend di diminuzione della sensibilità verso numerosi antibiotici dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati dal suino in un periodo di 10 anni ed un aumento della frequenza del fenomeno della multi-resistenza. Quanto esposto sottolinea la necessità di un continuo monitoraggio, in modo tale che appropriate strategie siano messe in atto per contrastare la tendenza precedentemente descritta. In particolare lo studio dei geni che regolano ed influenzano il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, già oggetto di approfondimento da parte di numerosi ricercatori, rappresenteranno la chiave per una maggior comprensione di questo fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

Barigazzi G., Foni E., Garbarino C. (2001) "Sensibilità agli antibatterici di microrganismi isolati dal suino nel periodo 1994-2000". Atti XXV Meeting Sipas, Parma 23-24 Marzo 2001, 295-303.

Barigazzi G., Foni E., Merialdi G., Dottori M. (2007) "Sensibilità agli antibatterici di microrganismi isolati dal suino nel periodo 2002-2006". Atti XXV Meeting Sipas, Modena 29-30 Marzo 2007, 289-301.

Burch D. (2005) "Problems of antibiotic resistance in pigs in the UK". In Practice. 27:37-43.

Enne V.I., Cassar C., Sprigings K., Woodward M.J., Bennett P.M. (2008) “A high prevalence of antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E.coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter”. FEMS Microbiol Lett. 278, 193-9.

Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005) “Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types pathogenesis and prevention strategies”. Animal Health Research Reviews. 6, 17–39.

Kozak G.K., Boerlin P., Janecko N., Reid-Smith R.J., Jardine C. (2009) “Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada”. Appl Environ Microbiol. 75:559–566.

Mathew A.G., Upchurch W.G., Chattin S.E. (1998) “Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms“. J Ani Sci. 76:429–434.

Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders F.J.M., Hilbert F. (2004) “Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry”. Int J Food Microbiol. 97:23–29.

NCCLS (2003) Performances Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – English Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6).

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

NCCLS (2004) Performances Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourtheenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Smith M.G., Jordan D., Chapman T.A., Chin J.J., Barton M.D., Do T.N., Fahy V.A., Fairbrother J.M., Trott D.J. (2010) “Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea”. Vet Microbiol. 145:299-307.

Stannarius C., Bürgi E., Regula G., Zychowska M.A., Zweifel C., Stephan R., Teshager T., Herrero I.A., Porrero M.C., Garde J., Moreno M.A, Dominguez L. (2000) “Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses”. Int J Antimicrob Agents. 15:137–142.

Taylor N.M., Clifton-Hadley F.A. Wales A.D., Ridley A., Davies R.H. (2009) “Farm-level risk factors for fluoroquinolone resistance in *E. coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on finisher pig farms”. Epidemiol Infect. 137:1121-34.

Vanni M., Merenda M., Barigazzi G., Garbarino C., Luppi A., Tognetti R., Intorre L. (2011). “Antimicrobial resi stance of Actinobacillus pleuropneumoniae isolated from swine”. Veterinary Microbiology; doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.022.

Yashpal S.M., Yogesh C., Karen O., Sagar M.G. (2011) “Antimicrobial resistance in enteric pathogens from Minnesota pigs from 1995 to 2004”. The Canadian Journal of veterinary research. 75:117-121.

INDAGINE SULLE CAUSE DI RIFORMA DELLE SCROFE NEL "SISTEMA ITALIANO" E CORRELAZIONE CON LE SCELTE GESTIONALI

STUDY OF THE CAUSES OF SOWS' REPLACEMENT CAUSES IN ITALIAN SWINE SYSTEM AND ASSOCIATION WITH FARM MANAGEMENT

SALA V.[1], MUSELLA C.[2], COSTA A.[3], GUSMARA C[1].

1. Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria
Università di Milano
2. Scuola di Specializzazione in Patologia Suina
Università di Milano
3. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare
Università di Milano

Parole chiave: scrofe, cause di riforma, indagine.
Key words: sows, replacement causes, investigation.

***Riassunto*.** Gli autori riportano e analizzano i risultati di una rilevazione mediante questionari a risposta multipla su 41 aziende suinicole italiane, per un totale di 36.900 scrofe. L'indagine ha riguardato le cause di riforma in correlazione con i fattori condizionanti e predisponenti presenti in allevamento. In particolare, sono state considerate tre cause di riforma: ipofertilità, malattie podali e infezioni urinarie. I dati derivati dall'indagine sono stati sottoposti ad analisi statistica per verificare le correlazioni tra le cause, con i fattori manageriali e con le caratteristiche strutturali dell'azienda. Infine, sulla base delle indicazioni emerse, sono state verificate le possibili motivazioni epidemiologiche.

***Abstract*:** The authors report and analyze the results of a survey by a multiple choice questionnaire performed on 41 Italian pig farms, for a total of 36,900 sows. The investigation focused on the causes of replacement in conjunction with conditioning and predisposing factors in the herd. In particular, three replacement causes have been considered, i.e. infertility, sow lameness and urinary tract infections. The data derived from the survey have been submitted to statistical analysis to verify the correlations among the causes, with the factors management and with the structural characteristics of the farm. Finally, on the basis of results the possible epidemiological reasons were verified.

INTRODUZIONE

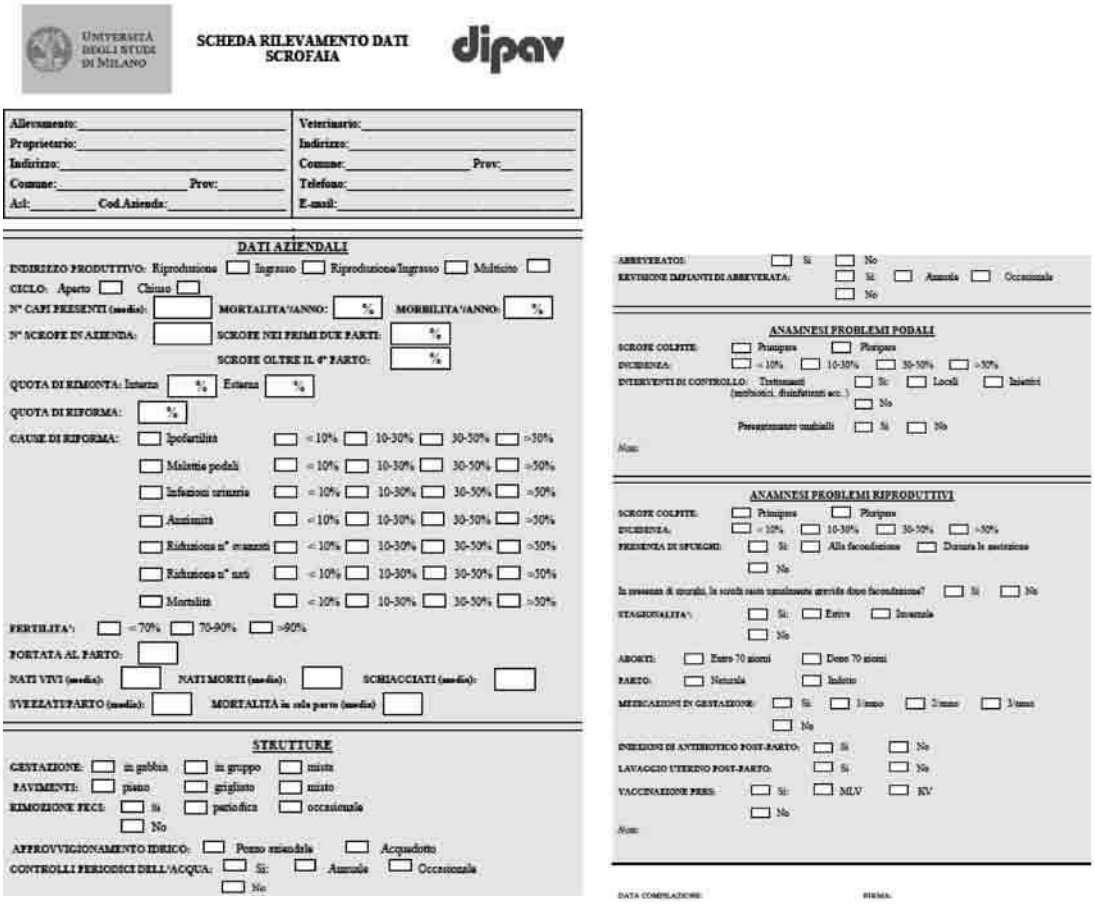
Le contingenze del settore suinicolo, contraddistinte dalla carenza di risorse economiche da investire, hanno spesso reso necessario posticipare le rimonte, o almeno rivederne la programmazione diminuendone la frequenza rispetto al passato: la principale conseguenza è stata il prolungamento "di necessità" della carriera delle scrofe pluripare, previa verifica della produttività attraverso l'analisi dei parametri di fertilità, portata al parto, nati vivi e svezzati per anno; in subordine, l'altro passaggio critico è il

mantenimento dell'integrità fisica della scrofa, considerando che esistono alterazioni in grado di determinare l'interruzione, non solo "accidentale" di carriere ancora molto produttive. Tra queste, le patologie podali e le infezioni dell'apparato urinario (UTI) sono cause altrettanto importanti di riforma non programmata.
L'oggettiva mancanza di dati organici sulla reale incidenza delle diverse cause di riforma delle scrofe nel sistema suinicolo nazionale ha motivato l'indagine della quale riportiamo qui i dati iniziali; in prima istanza, per valutare l'effettiva percezione delle diverse cause di riforma da parte degli allevatori, è stato proposto, attraverso un gruppo selezionato di medici veterinari operanti nel settore (che ringraziamo in calce al lavoro) un questionario per la rilevazione di dati aziendali mirati.
Sommariamente, gli obbiettivi individuati consistono, prima di tutto, nell'accertamento della rilevanza aziendale delle cause di riforma, riservando particolare attenzione alle differenze inter- e intra-aziendali correlate alle caratteristiche strutturali e alle scelte manageriali; in secondo luogo, sono state verificate le interazioni di potenziamento tra le tre principali cause di riforma (ipofertilità, UTI e malattie podali) e la loro corrispondenza con i fattori condizionanti nei diversi sistemi aziendali: tra questi, sono stati finora considerati genetica, pavimentazione, sistema di gestazione, approvvigionamento idrico, patologie concomitanti, interventi intra- e post-parto.
In una fase successiva del progetto, già in corso di realizzazione, si prevede di verificare, su un campione di aziende selezionate, la corrispondenza di quanto risultato dal questionario con l'evidenza oggettiva dei diversi problemi, oggettivati attraverso punteggi e indagini diagnostiche.

MATERIALI E METODI

Aziende e animali. L'indagine ha interessato a oggi 44 aziende suinicole (27 a ciclo aperto e 17 a ciclo chiuso) distribuite nelle regioni Piemonte, Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna, per un totale di 36.900 scrofe; 19 delle scrofaie considerate hanno meno di 500 scrofe, 13 un effettivo compreso tra 500 e 1000 animali, 5 tra 1000 e 1500, 5 tra 1500 e 2000, 2 più di 2000 scrofe.
Scheda di Rilevazione. Per una valutazione sistematica delle aziende partecipanti all'indagine è stata progettata e impiegata una scheda di rilevazione, organizzata per fornire dati statisticamente analizzabili (Figura 1); i dati richiesti hanno riguardato parametri manageriali, prestazionali e sanitari, scelti per mettere in risalto le cause di riforma. Altre indicazioni sono state richieste riguardo a strutture e disponibilità, considerando il loro ruolo condizionante l'incidenza della riforma.
Particolare attenzione, come si può vedere dalla scheda, è stata data ai rilievi anamnestici riguardanti i problemi podali, riproduttivi e urinari.
Gestione dei dati. I rilievi contenuti nelle singole schede sono stati categorizzati in un unico data-base, in modo da poter confrontare e analizzare le diverse serie di dati.
Analisi Statistica. I dati sono stati processati tramite procedura di frequenza (Proc FREQ SAS, SAS 9.2, 2012) per ottenere una visione d'insieme delle caratteristiche aziendali degli allevamenti.
Sempre impiegando lo stesso pacchetto statistico, è stato quindi condotto uno studio per evidenziare le correlazioni (Proc CORR) tra i parametri considerati nello studio.

Figura 1. Scheda di rilevazione. **Figure 1.** Record Card.



SCHEDA RILEVAMENTO DATI SCROFAIA

Allevamento: Proprietario: Indirizzo: Comune: Prov: Asl: Cod.Azienda:

Veterinario: Indirizzo: Comune: Prov: Telefono: E-mail:

DATI AZIENDALI

INDIRIZZO PRODUTTIVO: Riproduzione Ingrasso Riproduzione/Ingrasso Multisito

CICLO: Aperto Chiuso

N° CAPI PRESENTI (media): MORTALITA'/ANNO: % MORBILITA'/ANNO: %

N° SCROFE IN AZIENDA: SCROFE NEI PRIMI DUE PARTI: % SCROFE OLTRE IL 4° PARTO: %

QUOTA DI RIMONTA: Interna % Esterna %

QUOTA DI RIFORMA: %

CAUSE DI RIFORMA: Ipofertilità; Malattie podali; Infezioni urinarie; Anzianità; Riduzione n° svezzati; Riduzione n° nati; Mortalità — < 10% 10-30% 30-50% >50%

FERTILITA': < 70% 70-90% >90%

PORTATA AL PARTO:

NATI VIVI (media): NATI MORTI (media): SCHIACCIATI (media):

SVEZZATI/PARTO (media): MORTALITA in sala parto (media)

STRUTTURE

GESTAZIONE: in gabbia in gruppo mista

PAVIMENTI: pieno grigliato misto

RIMOZIONE FECI: Si periodica occasionale No

APPROVVIGIONAMENTO IDRICO: Pozzo aziendale Acquedotto

CONTROLLI PERIODICI DELL'ACQUA: Si: Annuale Occasionale No

ABBEVERATOI: Si No

REVISIONE IMPIANTI DI ABBEVERATA: Si: Annuale Occasionale No

ANAMNESI PROBLEMI PODALI

SCROFE COLPITE: Principio Pluripara

INCIDENZA: < 10% 10-30% 30-50% >50%

INTERVENTI DI CONTROLLO: Trattamenti (antibiotici, disinfettanti ecc.): Si: Locali Iniettivi No

Presenziamento zoppielli Si No

Note:

ANAMNESI PROBLEMI RIPRODUTTIVI

SCROFE COLPITE: Principio Pluripara

INCIDENZA: < 10% 10-30% 30-50% >50%

PRESENZA DI SPURGHI: Si: Alla fecondazione Durante la gestazione No

In presenza di spurghi, la scrofa resta normalmente gravida dopo fecondazione? Si No

STAGIONALITA': Si: Estiva Invernale No

ABORTI: Entro 70 giorni Dopo 70 giorni

PARTO: Naturale Indotto

MEDICAZIONI IN GESTAZIONE: Si: 1/anno 2/anno 3/anno No

INIEZIONI DI ANTIBIOTICO POST-PARTO: Si No

LAVAGGIO UTERINO POST-PARTO: Si No

VACCINAZIONE PRES: Si: MLV KV No

Note:

DATA COMPILAZIONE: FIRMA:

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1, qui di seguito, sono state catalogate le percentuali d'incidenza, suddivise per classi, delle diverse cause di riforma sul totale delle scrofe considerate

	N.C.	< 10%	10-30%	30-50%	> 50%
Ipofertilità	0	15	18	10	1
Lesioni podali	4	22	15	1	2
Infezioni Urinarie	17	22	4	1	0
Anzianità	3	5	18	12	6
Riduzione n. Nati	9	19	11	3	2
Riduzione n. Svezzati	12	17	11	4	0
Mortalità	3	34	7	0	0

Tabella 1. Cause di riforma, percentuali e aziende. (Legenda: N.C. = non considerata)
Table 1. Replacement causes, percentage and farms. (N.C. = not considered)

La numerosità delle aziende categorizzate nelle prime due colonne (N.C. e < 10%) rende conto del livello di percezione delle potenziali cause di riforma all'interno dei diversi sistemi: è evidente come la visibilità dei problemi ne condizioni la considerazione in ambito aziendale; infatti, nessun allevamento esclude a priori l'ipofertilità, che si manifesta in termini "produttivamente" visibili mentre diverse non valutano le infezioni urinarie che sono, tra tutte, le meno clinicamente individuabili. Diverse sono le implicazioni per quanto riguarda anzianità e mortalità, che, in tre allevamenti ciascuna non sono, di fatto, ritenute cause di riforma, quanto piuttosto eventi non catalogabili.

Correlazione		**r, %**	P <
Numero dei capi in azienda	Morbilità	71	<0,01
	Mortalità	56	<0,01
	Fertilità	-28	0,08
Morbilità	Mortalità	56	<0,01
	Aborti	-61	<0,05
Numero scrofe	Morbilità	61	<0,01
	Mortalità	35	<0,05
	Incidenza problemi riproduttivi	39	<0,05
Scrofe oltre 6° parto	Malattie podali	47	<0,01
	Aborti	31	0,08
	Nati/mortalità	45	<0,01
	Schiacciamento dei suinetti	34	0,08
Ipofertilità	Problemi riproduttivi nelle primipare	46	<0,01
	Endometriti (spurghi)	54	0,05
	Mortalità intra-parto	37	<0,05
Riduzione del numero di svezzati	Problemi riproduttivi nelle pluripare	-41	<0,05
Quota di Riforma	Problemi riproduttivi nelle primipare	34	<0,05
Malattie Podali	Pavimentazione in grigliato	44	<0,05

Tabella 2. Correlazioni (Pearson) su base statistica.
Table 2. Pearson Correlations on statistical basis.

Nella tabella 2 sono state riportate le correlazioni su base statistica tra le cause di riforma, i loro effetti e alcuni fattori strutturali; per una più facile interpretazione, ricordiamo che la significatività corrisponde a P<0,05, mentre i valori positivi, comunque vicini allo zero, possono avere, secondo le più recenti indicazioni, un valore probabilistico di "tendenza".
Alcune di queste correlazioni sono logiche, considerando la connotazione intensiva dell'allevamento suinicolo: così, s'intendono facilmente la corrispondenza tra l'incremento del numero degli animali in azienda, la morbilità e la mortalità (p<0,01) o tra queste e il numero delle scrofe (p<0,05); diversa è la situazione per le manifestazioni cliniche della malattia

riproduttiva: in questo caso, diventano decisivi alcuni fattori condizionanti, soprattutto di natura manageriale, come l'igiene della fecondazione artificiale e l'assistenza alla scrofa durante il puerperio. A dimostrazione di ciò, a un numero elevato di scrofe si associa sempre un maggior numero di patologie riproduttive ($p<0,05$) verosimilmente come conseguenza di una minor cura individuale, soprattutto in corrispondenza degli eventi più critici.
Primipare e pluripare hanno problemi produttivi diversi e determinano danni economici differenti: difficoltà nel portare a termine la prima gestazione e nella ricomparsa dell'estro sono le problematicità delle scrofe giovani ($p<0,05$); un maggior numero di aborti ($p=0,08$) una quota più alta di nati/mortalità ($p<0,01$) e un maggior numero di schiacciamenti ($p=0,08$) sono ciò che si osserva in quelle più anziane.
Facendo ancora riferimento alle scrofe pluripare, bisogna sempre considerare che, entro certi limiti, è "normale" che i problemi aumentino col procedere della carriera; tuttavia, come abbiamo premesso, se il prolungamento del servizio sta diventando una obbligo dettato da ragioni economiche, è parimenti indispensabile programmare correttamente i parametri di mantenimento e riforma.
L'ipofertilità che, come abbiamo detto, è il problema più percepito, perché è quello "produttivamente" più visibile, ma i suoi effetti non si esauriscono, secondo quanto riportano i questionari e soprattutto nelle primipare ($p<0,01$), nel mancato ingravidamento; infatti, esistono correlazioni statisticamente significative con la mortalità intra-parto ($p<0,05$) e probabili con la endometriti ($p=0,05$). È inoltre da segnalare la significatività della correlazione tra l'innalzamento della quota di rimonta e le problematiche riproduttive nelle primipare ($p<0,05$) con cause e implicazioni sia manageriali, sia sanitarie.
Una considerazione a parte meritano le malattie podali: nella loro genesi è direttamente coinvolto, com'è facile capire, lo stato delle pavimentazioni e quelle in grigliato di cemento hanno un effetto predisponente e causale assai rilevante ($p<0,05$); per quanto riguarda l'età degli animali e fatte salve le condizioni strutturali particolari di alcuni allevamenti, sono maggiormente interessate dal problema le scrofe oltre il sesto parto ($p<0,01$) è ciò è comprensibile, trattandosi di una lesione tipicamente riportabile all'usura delle strutture cornee del piede.
Non è invece stato possibile, in questo passaggio, stabilire una correlazione tra le patologie podali e lo schiacciamento dei suinetti neonati; tuttavia, sarebbe poco corretto negare che, quando si eseguono rilievi attraverso un questionario, le informazioni che si ricevono sono basate sulla sensibilità di chi risponde nei confronti dei problemi oggetto d'inchiesta, che influenza la percezione del danno indotto.
Le medesime considerazioni valgono per le infezioni urinarie, la cui rilevanza non può essere esclusa; infatti, la loro scarsa visibilità clinica le rende spesso di difficile identificazione.

CONCLUSIONI

I sistemi di rilevazione mediante questionario sono relativamente poco utilizzati, mentre potrebbero fornire utili informazioni per le scelte gestionali e sanitarie, soprattutto attraverso il confronto dei dati, quando sono disponibili, o delle osservazioni eseguite secondo schemi concordati; considerando le cause di riforma, la comparazione tra i dati di allevamenti diversi, soprattutto in correlazione con i fattori condizionanti di derivazione strutturale e manageriale, può produrre indicazioni utili e condivisibili per migliorare l'organizzazione del lavoro in scrofaia.
Un questionario predisposto e gestito su base statistica in forma anonima, rappresenta l'unica via per ottenere informazioni "di sistema" dagli allevatori italiani, che per abitudini e convinzioni sono poco disponibili a far circolare informazioni considerate "riservate";

internamente ai singoli allevamenti, il confronto tra annualità diverse di parametri di scrofaia predeterminati può essere di grande utilità, soprattutto in presenza di variazioni manageriali e strutturali.
Infine, un'indagine preliminare mediante questionario può rappresentare la base per la scelta degli allevamenti su cui applicare sistemi di punteggio in grado di oggettivare il problema e attivare un sistema di sorveglianza nel tempo.

RINGRAZIAMENTI.
Si ringraziano i colleghi che hanno permesso, con la loro disponibilità e il loro impegno, la realizzazione di questo lavoro: S. Andreoni, R. Bardini, E. De Vitali, M. Faccenda, P. Fantinati, J. Forlenza, P. Gualandi, S. Guerzoni, R. Madonna, C. Mazzoni, P. Mondin, M. Montesano, E. Scattolini, G. Pomari, F. Salvini, S. Taschini, G. Veronesi, S. Zavattini.

BIBLIOGRAFIA DI CONSULTAZIONE

- Anil S.S., Anil L. & Deen J. (2007). Factors associated with claw lesions in gestating sows. J. Swine Health Prod. 15: 78-83.
- Bonde M., Rousing T., Badsberg J.H. & Sorensen J.T. (2004). Associations between lying-down behaviour problems and body condition, limb disorders and skin lesions of lactating sows housed in farrowing crates in commercial sow herds. Livestock Production Science. 87: 179-187.
- Engblom L., Lundeheim N., Dalin A.M. & Andersson K. (2007). Sow removal in Swedish commercial herds. Livestock Science. 106: 76-86.
- Engblom L., Lundeheim N., Strandberg E., Schneider M.P., Dalin A.M. & Andersson K. (2008). Factors affecting length of productive life in Swedish commercial sows. J. Anim. Sci. 86: 432-441.
- Kirk R.K., Jorgensen B. & Jensen H.E. (2008). The impact of elbow and knee joint lesions on abnormal gait and posture of sows. Acta Vet. Scand. 50 (5) : 1-8.
- Ryan W.F., Lynch P.B. & O'Doherty J.V. (2010). Survey of cull sow bone and joint integrity in the Moorepark Research Farm herd. Vet. Rec. 166: 268-271.
- Schenck E. L., McMunn K. A., Rosenstein D. S., Stroshine R. L., Nielsen B. D., Richert B. T., Marchant-Forde J. N. & Lay D. C. (2008). Exercising stall-housed gestating gilts: Effects on lameness, the musculo-skeletal system, production, and behaviour. J. Anim. Sci. 86: 3166-3180.
- Stewart C.L., O'Connell N.E. & Boyle L. (2008). Influence of access to straw provided in racks on the welfare of sows in large dynamic groups. Applied Animal Behaviour Science. 112: 235-247.

INDAGINI SU HAEMOPHILUS PARASUIS COME CAUSA DI RIFORMA ANTICIPATA NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO

INVESTIGATION ON HAEMOPHILUS PARASUIS AS A CAUSE OF EARLY SLAUGHTER IN GROWING PIGS

VEZZOLI F.[1], BORELLA L.[1], SANTORO E.[1], LUPPI A.[2], BONILAURI P.[2], NEGRI M.[3], LUINI M. [1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi;
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione di Reggio - Emilia;
[3] A.S.L. della Provincia di Lodi.

Parole chiave: PRDC, *Haemophilus parasuis*, Sierotipizzazione, Genotipizzazione
Key words: PRDC, *Haemophilus parasuis*, Serotyping, Genotyping

Riassunto

Obiettivi - Il nostro lavoro ha indagato sul ruolo di *Haemophilus parasuis* come causa di riforma nei suini in accrescimento nell'intento di dare un contributo preliminare alle conoscenze sulla caratterizzazione sierologica e molecolare di questo microrganismo.

Materiali e metodi - In totale sono stati analizzati 89 suini provenienti da 9 diversi allevamenti, riformati anticipatamente ad un peso di 15/25 kg. Sono state registrate le lesioni anatomopatologiche, in particolare quelle a carico degli organi toracici, sui quali sono stati eseguiti esami batteriologici e PCR per *Mycoplasma Hyopneumonia*e. La viremia per PRRSV e PCV2 dei soggetti è stata analizzata con *Real-Time* PCR. I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati sierotipizzati tramite Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID) e genotipizzati con RFLP-PCR del gene *ompA* e con multiplex PCR dei geni *vtaA*.

Risultati - La lesione più frequentemente riscontrata è stata la broncopolmonite catarrale o catarral-purulenta (32), seguita da polisierosite fibrinosa (6), polmonite (4) e pleuropolmonite fibrino-necrotica (2). In 13 casi la broncopolmonite era accompagnata da quadri di pleurite (4), pericardite (2), pleurite e pericardite (6) fibrinose o da polisierosite fibrinosa (1). Nel complesso, il 54% degli animali presentava lesioni riferibili a PRDC. Sono stati isolati 14 ceppi di *Haemophilus parasuis* (15.7%), 6 di *Streptococcus suis* (6.7%), 6 di *Bordetella bronchiseptica* (6.7%), 5 di *Arcanobacterium pyogenes* (5.6%), 5 di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (5.6%) e 3 di *Pasteurella multocida* (3.5%). Cinque soggetti sono risultati positivi per *M. hyopneumoniae.* In 7 allevamenti su 8, sebbene con prevalenze differenti, gli animali testati sono risultati viremici per PRRSV (72.4%), mentre solo 5 soggetti lo sono risultati per PCV2 (5.7%). Dei 14 ceppi di *H. parasuis* isolati, 2 sono stati siero-tipizzati come sierotipo 13, 2 come sierotipo 14, 1 come sierotipo 4 e 1 come sierotipo 2. Sette ceppi sono risultati non tipizzabili con gli antisieri nei confronti di *Haemophilus parasuis* impiegati nello studio (sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, 14). La genotipizzazione ha evidenziato che 11 ceppi su 14 possedevano l, 2 e 3 *vtaA* mentre 3 ceppi solo 1 e 3 *vtaA*. Sono stati individuati 4 diversi profili RFLP-PCR (BA,BB,BD,CD), dei quali solo 1 presente in due allevamenti diversi. Due profili diversi sono anche stati riscontrati nello stesso allevamento.

Conclusioni - Lesioni a carico dell'apparato respiratorio riferibili a PRDC sono state il principale reperto di macellazione nei gruppi da noi considerati e *H. parasuis* è stato il microrganismo di più frequente isolamento. Ad eccezione del sierotipo 14, tutti i ceppi

sono risultati riportabili a sierotipi comunemente riscontrati in Italia e associati a patologia. Anche le analisi di genotipizzazione hanno evidenziato ceppi di *H. parasuis* appartenenti a genotipi associati a patologia, isolati raramente da soggetti sani. Un ampliamento della casistica che includa diversi profili clinico-patologici, compresi soggetti sani, potrebbe avvalorare l'importanza di queste analisi per caratterizzare i ceppi in funzione della diagnosi e della produzione di vaccini mirati.

ABSTRACT

Objectives - We have investigated the role of *Haemophilus parasuis* as cause of early slaughter in growing pigs. The serological and molecular characterization of the isolated strains has been carried out.

Methods - A total of 89 pigs from 9 different farms and early slaughtered at 15/25 kg were analyzed. Pathological lesions were recorded, with particular attention to those involving thoracic organs. The latter have been examinated with bacteriological analysis and PCR for the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. The PRRSV and PCV2 viremia was determinated by *Real-Time* PCR. *H. parasuis* isolates were serotyped by Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) using specific antisera against serovars 2, 4, 5, 12, 13, 14 and genotyped by PCR-RFLP of the *ompA* gene and by multiplex PCR of *vtaA* genes.

Results - Bronchopneumonia was the most frequently observed lesion (32), followed by polyserositis (6), pneumonia (4) and pleuropneumonia (2). In 13 cases, bronchopneumonia was associated with pleuritis (4), pericarditis (2), pleuritis and pericarditis (6) or polyserositis (1). Overall, 54% of the pigs showed lesions related to PRDC. Fourteen strains (15.7%) of *H. parasuis*, 6 (6.7%) of *Streptococcus suis*, 6 (6.7%) of *Bordetella bronchiseptica*, 5 (5.6%) of *Arcanobacterium pyogenes*, 5 (5.6%) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and 3 of *Pasteurella multocida* (3.5%) were isolated. Five subjects were found positive to *M. Hyopneumoniae*. PRRSV was found in pigs from all farms except one (72.4%), while only 5 subjects were PCV2 positive (5.7%). Out of 14 isolates of *H. parasuis*, 2 were serovar 13, 2 serovar 14, 1 serovar 4 and 1 serovar 2. The remaining seven strains were non-typable as serovars 2, 4, 5, 12, 13, 14. The genotyping showed that 11 of 14 strains possessed 1, 2 and 3 *vtaA* genes while 3 strains only 1 and 3 *vtaA*. Four different RFLP-PCR profiles (BA, BB, BD, CD) were identified, of which only 1 found in two different farms. One farm was found positive for two different profiles.

Conclusions - PRDC related lesions of the respiratory tract were the main findings in the groups we have considered and *H. parasuis* was the most frequently isolated microorganism. With the exception of serotype 14, all strains were assigned to serovars commonly found in Italy and considered very or moderately pathogenic. Moreover, as reported by the genotyping analysis, the *H. parasuis* strains belong to genotypes that are associated with disease and rarely isolated from healthy subjects. New investigations including pigs characterized by different clinicopathological profiles and healthy subjects could complete our preliminar data and obtain better diagnostic tools and more appropriated vaccines.

INTRODUZIONE

La redditività dell'allevamento suino è data dalla capacità di ottenere animali pronti per il macello nel minor tempo possibile, sfruttando al massimo le caratteristiche genetiche degli stessi, ottenendo un prodotto che che rispecchi le caratteristiche richieste dai macellatori e dai consumatori, ottenendo il miglior ritorno economico possibile riducendo al minimo i costi legati alle malattie, causa di perdite (scarti e mortalità) e spese per farmaci.

Le cause di riforma in suini in accrescimento sono numerose, sia di origine infettiva che legate a

fattori ambientali e gestionali e sono conseguenti a patologie che coinvolgono prevalentemente l'apparato respiratorio, gastroenterico e locomotore. In particolare, le infezioni respiratorie sono uno dei principali problemi sanitari in questa fase di allevamento e sono causa di importanti danni economici e riduzione del benessere degli animali allevati (Sorensen *et al.*, 2006). Il complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC) è una problematica multifattoriale che colpisce gli animali a partire dalle 12/14 settimane d'età (Thacker, 2001; Kim *et al.*, 2003, Hansen *et al.*, 2010), la cui morbilità e mortalità possono variare rispettivamente dal 10 al 40% e dal 2 al 20% (Harms *et al.*, 2002). L'impatto economico delle infezioni respiratorie è considerevole e risulta maggiore se l'infezione è precoce o è aggravata da altre infezioni o da avverse condizioni ambientali. Queste possono agire sui patogeni interagendo sulla loro diffusione (es. quantità di microorganismi a cui sono esposti gli animali) o sui suini stessi intervenendo sui meccanismi di difesa degli animali, sia innati che acquisiti (Gonyou *et al.*, 2006).

PRRSV (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus), PCV2 (Porcine Circovirus 2), SIV (Swine Influenza Virus) e PRV (Pseudorabies Virus) sono i principali virus coinvolti, mentre tra i batteri, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* sono quelli più frequentemente isolati in corso di PRDC, a cui si aggiunge *Mycoplasma hyopneumoniae*.

H. parasuis, agente eziologico della malattia di Glässer, è ritenuto fra i più importanti agenti coinvolti nella PRDC ed è responsabile di elevata morbilità e mortalità nei suini già a partire dalla fase di svezzamento (Oliveira and Pijoan, 2004). Da un punto di vista anatomopatologico l'infezione è caratterizzata da polisierosite fibrino-purulenta, artrite e meningite. *H. parasuis* può essere isolato anche nel tratto respiratorio superiore di suini sani come parte della normale flora batterica (Kielstein e Rapp-Gabrielson 1992; Oliveira and Pijoan 2004). Esistono almeno 15 diversi sierotipi di *H. parasuis* differenziati sulla base delle loro varianti antigeniche superficiali (Kielstein e Gabrielson, 1992). Sebbene alcuni sierotipi si siano dimostrati più virulenti rispetto ad altri, non è stata dimostrata una correlazione assoluta tra sierotipo e gravità della patologia nei gruppi colpiti. Questa associazione è complicata dal fatto che all'interno del medesimo sierotipo è stata riscontrata una certa variabilità di risposta e che una parte non trascurabile dei ceppi isolati non risulta tipizzabile con gli attuali mezzi a disposizione (Blackall *et al.*, 1997). Diverse tecniche di genotipizzazione sono state applicate nello studio della variabilità di *H. parasuis* e sono principalmente: fingerpritinting tramite ERIC-PCR (Rafiee *et al*., 2000), MLST (Olvera *et al.*, 2006a), analisi di sequenza parziale del gene codificante Hsp60 (Olvera *et al.*, 2006b) e PCR su geni che codificano fattori di virulenza. Le proteine di membrana (OMPs) e tra queste in particolare OmpA sono coinvolte in vari processi patogenetici tra i quali l'adesione ed invasione cellulare e per questo possono essere buoni indicatori di virulenza (Smith *et al.*, 2007; Dabo *et al.*, 2003; Prasadarao *et al.*, 1996). Recentemente è stata proposta la genotipizzazione basata su una PCR-RFLP del gene *ompA* che discrimina i ceppi in 8 genotipi (profili di restrizione), dei quali solo alcuni sarebbero associati a patologie caratteristiche dell'infezione da *H. parasuis* (Chu *et al.*, 2011). Un altro fattore di virulenza importante sarebbe rappresentato da VtaA, un autotrasportatore associato alla membrana, costituito da tre domini funzionali codificati dai geni 1 *vtaA*, 2 *vtaA* e 3 *vtaA*. Mentre 3 *vtaA* è altamente conservato in tutti i ceppi invasivi e non, 1 *vtaA* e 2 *vtaA* sono stati riscontrati solo nei ceppi invasivi e non in quelli isolati dalle vie respiratorie superiori. In particolare si potrebbero considerare virulenti tutti gli isolati che possiedono 1 *vtaA* e 3 *vtaA* (Olvera *et al*., 2011).

Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare sul ruolo di *H. parasuis* tra le cause di riforma dei suini in accrescimento. Secondo obiettivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare dal punto di vista sierologico e molecolare i ceppi di *H. parasuis* isolati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio è stato condotto su un campione di 89 suini da riforma di peso compreso tra 15 e 25 kg, di razza ibrido commerciale, macellati nel periodo settembre / dicembre 2011. Nell'indagine sono stati coinvolti suini provenienti da 8 allevamenti (6 a ciclo chiuso e 2 a ciclo aperto) delle provincie di Lodi, Milano, Cremona e Brescia e suini di una partita d'importazione olandese. In fase di macellazione, per ciascuna soggetto sono stati prelevati gli organi toracici, addominali e un campione di sangue. I campioni sono stati successivamente conferiti ai laboratori della sezione diagnostica di Lodi dell'IZSLER, dove si è proceduto alla registrazione dei quadri anatomopatologici ed ai successivi esami di laboratorio.

Esami batteriologici

Le analisi batteriologiche sono state eseguite su polmone, fegato, milza di ogni soggetto e, ove possibile, dal liquido pericardico. Le semine sono state eseguite su Agar Siero (10% siero equino), Mc Conkey Agar ed Agar Sangue (5% g.r. ovini) arricchito con uno striscio di *Staphylococcus aureus*, per la crescita dei batteri NAD-dipendenti come *H. parasuis*. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore (in termostato a CO2 al 10% per l'Agar Sangue). I batteri isolati sono stati tipizzati in base alle caratteristiche colturali e dopo colorazione di Gram attraverso test biochimici opportunamente allestiti o con gallerie miniaturizzate (API Biomerieux). Lo sviluppo di colonie sospette di *H. parasui*s (crescita satellite intorno allo *S. aureus*) è stato ulteriormente confermato tramite PCR secondo il metodo indicato da Oliveira *et al.* (2001). La ricerca di *M. hyopneumoniae* è stata eseguita su tessuto polmonare tramite PCR come descritto da Mattsson *et al.* (1995).

Esami virologici

Sono stati eseguiti sui campioni di siero di 8 aziende tramite PCR *Real-Time* per la ricerca di *Porcine Circovirus type 2* (PCV2) secondo il protocollo descritto da Olvera *et al.* (2004) e per la ricerca del virus della PRRS, utilizzando il kit TaqMan® NA and EU PRRSV (Ambion®-Applied Byosistem), che permette di differenziare il genotipo europeo da quello americano.

Caratterizzazione di *H. parasuis*

Sierotipizzazione - I ceppi isolati sono stati tipizzati mediante il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), tramite l'utilizzo di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12, 13 e 14 secondo il protocollo descritto da Luppi *et al.* (2010). La scelta dei sieri anti-*H. parauis* da impiegare nella tipizzazione dei ceppi isolati si è basata sulla valutazione dei dati di prevalenza raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi paesi europei (Blackall *et al*., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliveira and Pijoan , 2004; Angen *et al*., 2004). Oltre a questo parametro, nella scelta degli antisieri da utilizzare, è stato considerato il grado di virulenza dei singoli sierotipi (il pannello di antisieri a nostra disposizione permette la sierotipizzazione della maggioranza dei sierotipi a media e ad alta virulenza) e la possibilità di valutare l'eventuale omologia tra i sierotipi circolanti e quelli presenti nelle preparazioni vaccinali.

Genotipizzazione - E' stata condotta su colture batteriche risospese in PBS e dopo estrazione del DNA con il kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN). La PCR-RFLP del gene *ompA* è stata eseguita utilizzando i primers e il protocollo di reazione descritti da Chu *et al*. (2010). Il prodotto di PCR è stato sottoposto a RFLP con l'utilizzo separato di due enzimi *Mspa1I* e *DdeI* ed i profili di restrizione registrati secondo i possibili risultati: AA, BA, BB, BC, BD, CA, CB, CD. La genotipizzazione basata sui geni *vtaA* è stata eseguita secondo quanto descritto da Olvera *et al.*, 2011. La metodica prevede due PCR: una specifica per 2*vtaA* e una multiplex-PCR per rilevare 1 *vtaA* e 3 *vtaA*.

RISULTATI

Lesioni anatomopatologiche. Il maggior numero di osservazioni riguardano l'apparato respiratorio, dove pleuropolmoniti, broncopolmoniti e/o pleuriti/pericarditi, da sole o associate a polisierosite sono state osservate in 48 animali inclusi nello studio (54%). Sono stati registrati 32 casi di broncopolmonite, in 19 dei quali rappresentava l'unica lesione osservata a carico degli organi toracici. In 16 casi si trattava di broncopolmonite apicale catarrale o catarral-purulenta di modica estensione con consolidamento del parenchima ed iperemia più o meno evidente. In 3 casi l'interessamento polmonare era bilaterale ed esteso anche ai lobi diaframmatici, di cui 1 in presenza di numerosi ascessi. In 13 casi la broncopolmonite era accompagnata da quadri di pleurite (4), pericardite (2), pleurite e pericardite (6) fibrinose o da polisierosite fibrinosa (1). In 4 soggetti è stata evidenziata una polmonite bilaterale generalizzata, di cui 1 associata a pleurite fibrinosa, mentre in 2 soggetti sono stati evidenziati sequestri necrotici con pleurite circoscritta. In 6 soggetti è stata evidenziata polisierosite fibrinosa con interessamento pleurico, pericardico e peritoneale. In 5 casi le uniche lesioni osservate a carico degli organi toracici sono state: pleurite fibrinosa (3), grave pericardite fibrino-purulenta (1) e pericardite associata a pleurite fibrinosa (1). Le lesioni a carico dell'apparato gastroenterico sono state evidenziate principalmente a carico del grosso intestino, rappresentate da colite con dilatazione delle anse, presenza di contenuto schiumoso di colore grigiastro e presenza di noduli biancastri nella sottomucosa. Queste lesioni sono state osservate in 26 soggetti (29%). Mentre gastriti ed ulcere sono state osservate in 15 soggetti (17%). Le altre lesioni sono state osservate con frequenza notevolmente inferiore e vengono per completezza riportate in Tabella 1.

LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE	ALLEVAMENTO (N° CAMPIONI)									**TOTALE**
	A (10)	B (20)	C (10)	D (8)	E (10)	F (10)	G (7)	H (10)	I (4)	
BRONCOPOLMONITE	2	6	3	2	5	1	3	6	4	**32**
PLEURITE / PERICARDITE	3	2	1	1	2		3	3	3	**18**
POLISIEROSITE	4	1						1		**6**
PLEUROPOLMONITE			1		1					**2**
POLMONITE		1	2		1					**4**
ENDOCARDITE VALVOLARE	1									**1**
ENTERITE / ENTEROCOLITE	1	5	8	4	1	3	2	2		**26**
DEGENERAZ. EPATICA	1			1	1	1	2			**6**
GASTRITE CRONICA				1		4				**5**
ULCERA GASTRICA				1	3		3	3		**10**
ERNIE ADDOMINALI/ INGUINALI		1			2	2				**5**
DERMATITE			5	3						**8**
ARTRITE / ARTROSINOVITE	3		1				1	3		**8**
ANEMIA GENERALIZZATA	1									**1**

Tabella 1. *Rassegna delle lesioni anatomopatologiche riscontrate nei 9 allevamenti inclusi nello studio.*
Table 1. *Review of the pathologic lesions observed in the 9 farms involved in the study.*

Esami batteriologici. Gli esiti delle indagini batteriologiche mettono in evidenza come *H. parasuis* sia stato il patogeno più frequentemente riscontrato, con un totale di 14 isolamenti, interessando 6 dei 9 allevamenti considerati. Gli altri microrganismi isolati sono risultati in ordine di frequenza: *Streptococcus suis* (6.7%), *Bordetella bronchiseptica* (6.7%), *Arcanobacterium pyogenes* (5.6%), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (5.6%), *Pasteurella multocida* (3.5%). In 4 casi *H. parasuis* è stato isolato in associazione con *Streptococcus suis*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae* e *A. pyogenes* (Tabelle 2 e 3). I dati relativi alle sedi di isolamento dei ceppi di *H. parasuis* sono riportati in dettaglio nella tabella 5 a cui si rimanda. La ricerca di *M. hyopneumoniae* mediante PCR ha evidenziato 4 campioni positivi nei suini di provenienza olandese ed 1 positivo nell'allevamento G.

ALLEVAMENTO	ESITI BATTERIOLOGICI
A	*H. Parasuis / P. multocida*
B	*H.. Parasuis*
C	*A. Pleuropneumoniae / S. Suis*
D	*H. Parasuis / P. Multocida*
E	*H. Parasuis / A. Pleuropneumoniae / P. multocida / S. Suis*
F	*H. Parasuis / S. Suis*
G	*A. Pyogenes / S. Suis / M. hyopneumoniae*
H	*B. Bronchiseptica / S. Suis*
I	*A. Pyogenes / H. parasuis / B. Bronchiseptica / S. suis /M. hyopneumoniae*

Tabella 2. *Risultati degli esami batteriologici per ciascun allevamento di provenienza.*
Table 2. *Results of the bacteriological examinations for each farm.*

BATTERI ISOLATI	ANIMALI POSITIVI		N° AZIENDE POSITIVE
	N°	%	
H. Parasuis	14	15.7%	6
S. Suis	6	6.7%	6
B. Bronchiseptica	6	6.7%	2
A. Pyogenes	5	5.6%	2
A. Pleuropneumoniae	5	5.6%	2
*M. hyopneumoniae**	5	5.6%	2
P. Multocida	3	3.5%	3

Tabella 3. *Isolamenti batterici in ordine di frequenza e numero delle aziende in cui ciascun patogeno è stato riscontrato.* Evidenziato tramite PCR.*
Table 3. *Bacterial isolates ranked by isolation frequency and number of farms in which each pathogen was found.*
** Detected by PCR..*

Esami virologici - L'infezione da PRRSV è stata dimostrata in 7 delle 8 aziende campionate, con prevalenza variabile dal 63% al 100% dei soggetti analizzati. Complessivamente sono stati esaminati i sieri di 87 animali e di questi il 72.4% sono risultati positivi alla PCR *Real-Time*. Il titolo virale (espresso in log $_{10}$ copie cDNA) è risultato variabile fra 2.8 e 8.9 con medie intra-allevamento comprese fra 3.6 e 8.0 (Tabella 4). Relativamente all'infezione da PCV2, sono risultati positivi 5 soggetti, appartenenti a 3 diversi allevamenti, con una percentuale di positività complessiva del 5.7%. I soggetti di un solo allevamento sono risultati completamente negativi verso entrambe le infezioni virali indagate.

AZIENDA	N° CAMP.	PRRSV			PCV2		
		N° POS.	% POS.	TITOLO*	N° POS.	% POS.	TITOLO**
A	11	9	81.8%	7.5 (4.0-8.5)	0	-	-
B	19	12	63.2%	7. 1 (3.7-8.0)	0	-	-
C	10	10	100%	6.6 (3.6-7.3)	0	-	-
D	9	7	77.8%	3.6 (2.8-4. 1)	3	33.3%	3.7 – 3.2 – 4.5
E	10	9	90%	5.8 (3.4-6.6)	0	-	-
F	10	0	-	-	0	-	-
G	8	6	75%	6.8 (3.4-7.6)	1	12,5%	4.0
H	10	10	100%	8.0 (4.6-8.9)	1	10%	5.8

Tabella 4. *Numero e percentuale dei soggetti risultati postivi verso PRRSV e PCV2 nelle aziende incluse nello studio e relativa titolazione virale. *Media log$_{10}$ copie di cDNA (limiti minimo e massimo);** log $_{10}$ copie di DNA.*
Table 4. *Number and percentage of PRRSV and PCV2 positive subjects for each farm and their relative viral titer.*
** mean log $_{10}$ copies of cDNA (minimum and maximum); ** log $_{10}$ copies of DNA.*

Caratterizzazione di *H. parasuis*. I 14 ceppi sottoposti a sierotipizzazione sono stati identificati come sierotipo 13 (2/14), sierotipo 14 (2/14), sierotipo 2 (1/14) e sirotipo 4 (1/14) mentre 7 dei 14 ceppi sono risultati non tipizzabili come sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, 14. La genotipizzazione ha evidenziato che 11 ceppi su 14 possedevano l, 2 e 3 *vtaA* e 3 ceppi solo 1 e 3 *vtaA*. Sono stati individuati 4 diversi profili RFLP (BA, BB, BD e CD), dei quali BD presente in 2 allevamenti diversi. Due profili diversi sono anche stati riscontrati nello stesso allevamento (BB e BD). (Tabella 5).

AZ.	N°	LESIONI	FONTE	PCR *vtaA*	RFLP	SIEROT.
A	2	ARTROSINOVITE, POLISIEROSITE FIBRINOSA	PERICARDIO	1,2,3-*vtaA*	BB	13
		ARTROSINOVITE, POLISIEROSITE FIBRINOSA	PERICARDIO	1,2,3-*vtaA*	BB	13
B	5	BRONCOPOLMONITE APICALE, PERICARDITE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BB	4
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,3-*vtaA*	BD	*
		POLMONITE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BD	*
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,3-*vtaA*	BD	*
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BD	*
D	1	BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BA	2
E	3	PLEUROPOLMONITE	POLMONE	1,3-*vtaA*	nd	nd
		BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	CD	*
		PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	CD	*
F	1	BRONCOPOLMONITE APICALE	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BD	*
I	2	PERICARDITE, PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA CON ASCESSI	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	BA	14
		PLEURITE, BRONCOPOLMONITE BILATERALE GENERALIZZATA	POLMONE	1,2,3-*vtaA*	nd	14

Tabella 5. *Risultati della sierotipizzazione e genotipizzazione di H. parasuis e correlazione con i quadri anatomopatologici osservati a carico degli organi toraci. nd: dato non disponibile; * ceppo non appartenente ai sierotipi 2,4,5,12,13,14.*
Table 5. *Results of serotyping and genotyping of H. parasuis and their correlation with pathological lesions observed in thoracic organs. nd: data not available; * strain not belonging to serotypes 2,4,5,12,13,14.*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia come le infezioni che concorrono a determinare la PRDC siano la principale causa di riforma nei gruppi di animali considerati, nei quali l'infezione da PRRSV ha probabilmente svolto un ruolo molto importante, sia direttamente che agendo sinergicamente con altri virus o batteri. L'altissima diffusione di questo virus nella fase di allevamento considerata è dimostrata dal 72% di animali viremici, dato peraltro atteso, trattandosi di un'infezione che colpisce soprattutto soggetti di età compresa tra le 8 e 12 settimane (Pavesi *et al.*, 2011). Solo 5 animali (5,7%) sono risultati viremici per PCV2. Questo risultato, se da una parte conferma la circolazione di questo virus negli allevamenti, dall'altra suggerisce, vista l'elevata diffusione della vaccinazione, una buona capacità della stessa a limitare la durata della viremia e la carica virale (Fort *et al.*, 2009).
I batteri isolati dai polmoni sono quelli comunemente osservati a carico dall'apparato

respiratorio di suini con PRDC. Fra questi *H. parasuis* è quello risultato maggiormente diffuso, il che conferma il ruolo dello stesso come importante causa di riforma in suini in accrescimento. Questa elevata percentuale di isolamento può essere stata facilitata dall'utilizzo di campioni ottimamente conservati ed analizzati entro poche ore dalla macellazione. Anche in altri soggetti dove *H. parasuis* non è stato isolato erano presenti lesioni riferibili a polisierosite da cui non è stato ottenuto l'solamento di altri patogeni batterici, salvo *Bordetella bronchiseptica* in un caso. Non è pertanto da escludere un suo maggiore coinvolgimento nel determinismo delle patologie osservate. In numerosi casi il reperto di macellazione associato all'isolamento di *H. parasuis* era rappresentato da una semplice broncopolmonite apicale che potrebbe rappresentare la lesione iniziale prima dell'interessamento delle sierose e successiva evoluzione in polisierosite. Per quanto riguarda *M. hyopneumoniae*, negli allevamenti in esame è stata osservata una bassa prevalenza, con solo due aziende risultate positive. Questo è in linea con quanto descritto in letteratura, dove la polmonite enzootica viene descritta prevalentemente in animali nelle fasi di magronaggio e ingrasso (Sorensen *et al.*, 2006).

Il numero di ceppi sierotipizzati in questa fase preliminare del lavoro non permette di eseguire valutazioni sulla prevalenza dei diversi sierotipi circolanti sul nostro territorio. Tuttavia appare interessante segnalare la presenza di due ceppi identificati come sierotipo 14, isolati da suini d'importazione olandese, di cui non risultano precedenti segnalazioni in Italia (Iodice *et al.*, 2011).

I ceppi tipizzati sono tutti appartenenti a sierotipi considerati ad alta o moderata virulenza come descritto da Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992. Sulla base dei risultati di sierotipizzazione e genotipizzazione risulta, ad eccezione di un caso, che in ognuno degli allevamenti testati è presente un solo genotipo/sierotipo. Le analisi di genotipizzazione di *H. parasuis* sono state mirate alla caratterizzazione di VtaA e Omp, fattori di virulenza che ne determinano il grado di patogenicità. Relativamente alle *vtaA* i ceppi isolati da noi possedevano tutti almeno 1 *vtaA* e 3 *vtaA* associate secondo Olvera *et al*. (2011) ai ceppi virulenti. Per quanto riguarda la genotipizzazione di *ompA* mediante PCR-RFLP, i nostri risultati evidenziano i genotipi BA, CD e BD associati a patologia e non evidenziati in ceppi isolati da cavità nasali o da organi senza lesioni (Chu *et al.*, 2011). Il genotipo BB da noi isolato in un allevamento non è stato associato dagli autori a patologia, ma nello studio citato è rappresentato da soli 2 ceppi.

Il numero ridotto di ceppi considerati e l'alto numero di ceppi non tipizzabili sierologicamente non consente di evidenziare alcuna correlazione fra sierotipi e genotipi. Questo ci porta a considerare i metodi molecolari come una valida alternativa alla tipizzazione su base sierologica, quantomeno per indagini epidemiologiche. Tuttavia, la tipizzazione su base sierologica rimane per ora l'unico mezzo diagnostico 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).

La mancanza nella nostra casistica di ceppi isolati da cavità nasali o da organi di animali sani non ci permette di confermare le conclusioni degli autori cui i metodi fanno riferimento. Oltre a questo occorre considerare che i fattori di virulenza di *H. parasuis* sono molteplici e non completamente definiti e quindi ulteriori ricerche sono necessarie per identificare quei fattori in grado di differenziare chiaramente i ceppi virulenti e permettere la produzione di vaccini ad ampio spettro.

BIBLIOGRAFIA

Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004) ”Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates”. Vet Microbiol. 103, 255-258.

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.

Blackall P., Trott D.J., Rapp-Gabrielson V., Hampson D.J. (1997) “Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis”. Vet Microbiol. 56, 125-134.

Chu Y.F., Gao P.C., Zhao P., He Y., Zhang N.Z., Liu Y.S., Liu J.X., Lu Z.X. (2011) “Genotyping of *Haemophilus parasuis* isolated from northwest China using PCR-RFLP based on the *ompA* gene”. J Vet Med Sci. 73 (3), 337-43.

Dabo S.M., Confer A.W., Quijano-Blas R.A. (2003) “Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules”. Microb Pathog. 35, 147-157.

Fort M., Sibila M., Pérez-Martín E., Nofrarías 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.

Gonyou H. W., Lemay S.P., Zhang Y. (2006) “Effects of the environment on productivity and disease”. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of swine”, 9a ed., Oxford, Blakwell Publishing, 1027-1038.

Hansen M.S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M., Nielsen O.L. (2010) “An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark”. J Comp Pathol. 143, 120-131.

Harms P.A., Halbour P.G., Sorden S.G. (2002) “Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection”. J Swine Health Prod. 10, 27-30.

Iodice G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Maioli G., Dottori M., Merialdi G., Leonelli R., Merenda M., Biasi G., Luppi A. (2011) “Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati dal suino nel Nord Italia: aggiornamento dei risultati”. In: XXXVII Meeting Annuale SIPAS, Piacenza, 24-25 Marzo 2011, Italia, 196-202.

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.

Kim J., Chung H.-K., Chae C. (2003) “Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex”. Vet J. 166, 251-256.

Luppi A., Bonilauri P., Ferrari E., Gherpelli Y., Merialdi G., Dottori M. (2010) "Sierotipizzazione di ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati da campioni patologici". In: XXXVI Meeting Annuale SIPAS, Montichiari, 25-26 Marzo 2010, Italia, 205-211.

Mattsson J.G, Bergstrom K., Wallgren P., Johansson KE. (1995) "Dection of *Mycoplasma yopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16 SrRNA gene. J. Clin. Microbiol. 33 (4), 893-897.

Oliveira S., Galina L., Pijoan C. (2001) "Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections". J of Vet Diagn Invest. 13, 495-501.

Oliveira S., Pijoan C. (2004) *"Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control". Vet Microbiol. 99, 1-12.

Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Ségales J., Domingo M. (2004) "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a Real Time PCR in postweaning multisystemic wasting sindrome and porcine dermatitis and nephropathy sindrome naturally affected pigs". J Virol Methods. 117, 75-80.

Olvera A., Cerda`-Cue´ llar M. and Aragon V. (2006a) "Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing". Microbiology. 152, 3683–3690.

Olvera A., Calsamiglia M., and Aragon V. (2006b) "Genotypic Diversity of *Haemophilus parasuis* Field Strains". Appl Environ Microbiol. 72 (6), 3984–3992.

Olvera A., Pina S., Macedo N., Oliveira S., Aragon V., Bensaid A. (2011) "Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (*vtaA*)". Vet J. Epub. 17 Gennaio 2011.

Pavesi R., Cevidalli A., Blanchaert A., Cominotti F., Nassuato C., Boniotti B., Alborali L. (2011) "Profilo sierologico e virologico dell'infezione da PCV-2 e PRRSV in 10 allevamenti suini italiani". In: XXVII Meeting Annuale SIPAS, Piacenza, 24-25 Marzo 2011, Italia, 342-350.

Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., Kim K.S. (1996) "Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells". Infect Immun. 64,146-153.

Rafiee M., Bara M., Stephens C. P., Blackall P.J. (2000) "Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*". Aust. Vet. J. 78, 846–849.

Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992) "Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine". Am J Vet Res. 53, 659–664.

Smith S.G., Mahon V., Lambert M.A., Fagan R.P. (2007) "A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression". FEMS Microbiol Lett. 273 (1), 1-11.

Sorensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006) “Diseases of the respiratory system”. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of swine”, 9a ed., Oxford, Blakwell Publishing, 149-177.

Thacker E.L. (2001) “Immunology of the respiratory disease complex”. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 17, 551-565.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche sono state eseguite con il contributo del Progetto Regione Lombardia 2009 RELOPROZOO.
Si ringrazia la sig.ra Sala Lorenza per il competente supporto tecnico nello svolgimento delle analisi molecolari.

STUDIO DELLE MANIFESTAZIONI CLINICHE, DELLE MODIFICAZIONI ANATOMICHE E DEL PATTERN INFIAMMATORIO CITOCHINICO NEL LIQUIDO BRONCO-ALVEOLARE IN SUINI AFFETTI DA MALATTIA RESPIRATORIA ACUTA SPONTANEA DA ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

STUDY ON THE CLINICAL SIGNS, THE ANATOMIC CHANGES AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE PATTERN IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUIDS OF PIGS SUFFERING FROM SPONTANEOUS ACUTE RESPIRATORY DISEASE CAUSED BY ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

P. ARDIGÒ[1], L. FERRARI[1], M. MORGANTI[1], E. DE ANGELIS[1], A. LUPPI[2], Y. GHERPELLI[2], G. MERIALDI[3], A. VOLTA[1], G. GNUDI[1], R. SALERI[4], P. BORGHETTI[1], P. MARTELLI[1]

[1]Dipartimento di Salute Animale - Università di Parma;
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Reggio Emilia;
[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Bologna;
[4] Dipartimento di Produzioni animali, Biotecnologie Veterinarie e Sicurezza Alimentare Università di Parma

Parole chiave: malattia respiratoria acuta, citochine, proteine di fase acuta (APP), liquido bronco-alveolare (BALF), suino.

Key words: acute respiratory disease, cytokines, acute phase proteins (APP), broncho-alveolar lavage fluid (BALF), pig.

Riassunto
Scopo del presente lavoro è stato la valutazione dell'evoluzione delle manifestazioni cliniche, dei quadri radiografici polmonari *in vivo* e del pattern infiammatorio/ immunitario citochinico nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero di suini sottoposti a trattamento antibatterico con amoxicillina per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Lo studio è stato compiuto su suini ibridi commerciali con malattia respiratoria spontanea acuta. Gli animali sono stati monitorati per 20 giorni dopo somministrazione intramuscolare di amoxicillina effettuata all'esordio della sintomatologia. La sintomatologia clinica respiratoria, la mortalità correlata, le lesioni polmonari e la presenza di agenti batterici e virali responsabili di co-infezione sono state determinate rispettivamente mediante score clinico, esame radiografico, indagini batteriologiche sul BALF e sierologia; la reattività infiammatoria/immunitaria è stata valutata come livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α)/immunitarie (IL-10) e proteine di fase acuta (CRP, aptoglobina, LBP) mediante ELISA e real-time PCR.

Si è evidenziato un decorso clinico della patologia respiratoria caratterizzato da una fase iniziale di acuzie associata a lesioni polmonari radiografiche a carattere di consolidamento prevalentemente a livello delle porzioni dorso-caudali ed una successiva evoluzione fino alla pressoché completa remissione dei sintomi. La mortalità è stata riconducibile a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, sierotipo 9. I markers infiammatori hanno mostrato un incremento iniziale e successiva riduzione in associazione all'evoluzione della malattia respiratoria, pur con variazioni individuali e con tipologia di andamento differente. Anche se caratterizzato da maggior variabilità, l'andamento della citochina immunoregolatrice negativa IL-10 si è modificato in relazione allo stato infiammatorio, a testimonianza di una regolazione concertata tra meccanismi di reattività cellulare in presenza di infezione.

Abstract

The aim of the present work was the evaluation of the evolution of the clinical signs, pulmonary lesions at radiography and inflammatory/immune cytokine patterns in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum of pigs treated with amoxicillin for the control of spontaneous acute respiratory disease sustained by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The study was performed using crossbred conventional pigs showing acute respiratory disease; the animals were monitored for 20 days after intramuscular administration of amoxicillin at the onset of clinical signs. Respiratory clinical signs, mortality associated with respiratory disease, pulmonary lesions and the presence of bacteria and viruses responsible of co-infections were determined respectively by clinical scores, radiography, bacteriology on BALF and serology; the inflammatory/immune reactivity was evaluated as levels of pro-inflammatory (IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α)/immune (IL-10) cytokines and acute phase proteins (CRP, haptoglobin, LBP) by ELISA and real-time PCR. Clinical, microbiological, radiological and biochemical-clinical analyses did not show different outcome among animals. All subjects showed a clinical outcome of acute respiratory disease characterized by pulmonary consolidation (especially dorsal-caudal) radiographic views. Mortality was due to pleuropneumonia associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 9. The pro-inflammatory markers showed an increase and subsequent decrease associated with the development of respiratory disease, despite individual levels and courses were different. The IL-10 course resulted more variable and changes in association with the inflammatory cytokine levels, testifying a concerted regulation of cellular reactivity following infection.

INTRODUZIONE

Nelle attuali condizioni dell'allevamento suinicolo, il controllo delle patologie respiratorie non può più avvalersi del solo contributo dell'intervento chemioterapico-vaccinale, soprattutto perché ben più ampio appare lo scenario che caratterizza l'approccio ad un'infezione e che globalmente coinvolge l'allevamento nella sua interezza. In argomento di prevenzione delle patologie ad impatto produttivo e di controllo delle infezioni che le caratterizzano, l'interesse viene oggi rivolto all'adozione di programmi sanitari combinati, applicati secondo criteri che necessariamente impongono il superamento della "fase empirica della medicina veterinaria applicata all'allevamento" per adottare una sempre più razionale strategia che nella sua complessità consideri svariati aspetti che vanno ben oltre la vaccinazione e l'impiego degli antibiotici e che coinvolgono le scelte gestionali ed ambientali.

L'applicazione strategica di questi programmi combinati nei confronti di un'infezione o di più infezioni (co-infezioni) deve considerare in primo luogo il conseguimento di

una diagnosi eziologica frutto di un percorso diagnostico collaterale di laboratorio che accerti il ruolo delle singole infezioni e, successivamente, fissi l'obiettivo che si vuole raggiungere in termini di controllo attraverso l'applicazione degli strumenti di profilassi e terapia più idonei e mirati a contrastare la situazione specifica della realtà produttiva in questione anche in relazione alle potenzialità manageriali e strutturali (Marois et al., 2009, Merialdi et al., 2011).
Nell'impostazione di questi protocolli combinati di intervento, sempre maggiore rilevanza viene assunta dalla conoscenza dell'epidemiologia delle infezioni che scaturisce da evidenze diagnostiche sperimentali proprie di ciascuna realtà produttiva. Non meno importante appare l'obiettivo di fornire un contributo alla conoscenza dell'evoluzione della malattia respiratoria acuta sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae* a seguito di trattamento antibatterico specifico, soprattutto in relazione all'evoluzione anatomica e funzionale (clinica) dei quadri patologici (Bosse et al., 2002; Lauritzen et al., 2003, Thacker et al. 2006).
Scopo del presente lavoro è stato verificare, per un periodo di osservazione di 20 giorni dalla comparsa dello stato febbrile e delle manifestazioni respiratorie (dispnea), l'evoluzione delle manifestazioni cliniche, delle lesioni polmonari in vita mediante esame radiografico, e del pattern infiammatorio citochinico nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero di suini sottoposti a trattamento antibatterico con amoxicillina per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da batteri sensibili.

MATERIALI E METODI

Animali

I suini allocati nello studio sono stati selezionati nell'ambito di gruppi in cui la presenza di polmonite batterica (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. e/o altri microrganismi) è stata confermata mediante l'evidenza di lesioni anatomopatologiche specifiche e dai rilievi microbiologici nell'allevamento di origine. Per poter essere incluso nello studio, ogni singolo animale ha soddisfatto i seguenti criteri di inclusione: a) febbre (T>40.0°C) e b) score clinico (somma di score dispnea + depressione del sensorio) ≥ 3.

Nello studio sono stati inclusi 10 suini ibridi commerciali, 5 maschi e 5 femmine, di circa tre mesi, del peso medio di 15 kg. I suini, alla comparsa della malattia spontanea, sono stati ricoverati come degenti presso le idonee strutture dell'unità di isolamento dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma per tutta la durata del periodo di osservazione e alimentati con mangime per suini del commercio non medicato, con disponibilità *ad libitum* di acqua ed alimento. La cura degli animali e l'accesso alle strutture è avvenuto nel rispetto delle procedure operative standard della struttura ospitante.

Il giorno dell'inclusione i suini sono stati identificati mediante marche auricolari numerate e trattati con amoxicillina per via intramuscolare secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice per quanto attiene al dosaggio e durata del trattamento.

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad un esame clinico giornaliero dal giorno 0 al giorno 20, alla stessa ora ogni giorno. Il giorno 0, 5, 10 e 20 i suini sono stati pesati individualmente.

I parametri clinici osservati/annotati e il relativo punteggio sono riportati nella tabella 1.

Dispnea	0 = assente (respirazione normale) 1 = lieve/moderata (lieve aumento dello spostamento della gabbia toracica e lieve respirazione addominale, respirazione a bocca chiusa) 2 = media (marcato aumento dello spostamento della gabbia toracica e della respirazione addominale, respirazione a bocca chiusa) 4 = grave (marcato aumento dello spostamento della gabbia toracica e della respirazione addominale, respirazione a bocca aperta)
Tosse (individuale)	0 = assente 1 = lieve/moderata (presente in seguito a sollecitazione*) 2 = grave (anche spontanea) * = *stimolo ad alzarsi e/o camminare*
Scolo nasale	0 = assente 1 = presente
Depressione del sensorio	0 = assente 1 = lieve/moderata 2 = grave 4 = morte
Osservazioni concomitanti (si/no)	I sintomi nervosi II diarrea III altro (specificato)
Reazioni al punto di iniezione	I arrossamento (eritema) II tumefazione III ascesso IV altro

Tabella 1. Parametri clinici considerati e relativo punteggio in funzione della gravità.
Table 1. *Clinical signs and scores based on severity.*

Mortalità/necroscopia
Tutti i casi di morte sono stati annotati. Su ogni suino morto è stato effettuato un esame anatomopatologico macroscopico, con particolare attenzione e descrizione delle lesioni polmonari.

Indagini radiografiche
Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad indagine radiografica nelle due proiezioni ortogonali (LL: latero-laterale e DV: dorso-ventrale) al momento dell'inclusione (tempo 0) e dopo 5, 10 e 20 giorni dall'esordio della fenomenologia clinica al fine di valutare l'estensione e l'evoluzione delle lesioni *intra vitam*. Al fine di permettere il contenimento dell'animale e l'immobilità necessaria per l'esecuzione delle indagini radiografiche, i soggetti sono stati sottoposti a sedazione mediante impiego di azaperone e ketamina ai dosaggi consigliati.
Ciascuna indagine radiografica (due proiezioni ortogonali) per ogni animali ai diversi tempi, oltre ad essere stata descritta riguardo all'estensione e gravità dei quadri, è stata sottoposta a valutazione mediante attribuzione di un punteggio in grado di qualificare la gravità e l'estensione del danno anatomico.
La valutazione della gravità (sede di interessamento della polmonite, grado di estensione delle lesioni) al fine di permettere l'attribuzione di un punteggio è avvenuta applicando lo schema di scoring comunemente adottato per la valutazione delle lesioni macroscopiche polmonari in sede di macellazione secondo Madec (Figure 1).

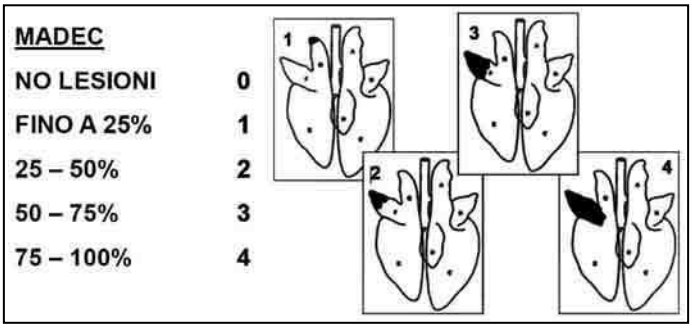


Figura 1: Griglia di Madec. Per ogni lobo viene assegnato un punteggio da 1 a 4, dipendente dalla estensione della lesione. Il punteggio massimo ottenibile è 28.
Figure 1*: Madec grid. Each lobe affected by pneumonia is scored from 1 to 4, depending on the extension of the lesion. The highest score is 28.*

Prelievi di campioni di sangue
Al momento dell'inclusione (0) e dopo 5, 10 e 20 giorni sono stati eseguiti prelievi di sangue venoso dalla vena giugulare; l'emosiero è stato separato mediante centrifugazione a 400 xg per 10 min. e congelato a -80°C fino all'analisi.

Prelievo di liquido bronco-alveolare
Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo di liquido bronco-alveolare (BALF) al momento dell'inclusione (tempo 0) e dopo 5, 10 e 20 giorni in presenza dello stato di sedazione farmacologicamente indotto in occasione dell'esecuzione degli accertamenti radiografici. Il prelievo di BALF è stato effettuato utilizzando le usuali metodiche. Dal BALF ottenuto è stata predisposta un'aliquota per le analisi virologiche e batteriologiche. Il restante volume è stato centrifugato a 400 xg per 10 min., il surnatante è stato congelato a -80°C per la quantificazione di citochine pro-infiammatorie e proteine di fase acuta mediante ELISA mentre il pellet cellulare è stato risospeso in RPMI-1640 + 50% FBS + 10% DMSO e congelato in azoto liquido fino all'estrazione dell'RNA.

Esami su liquido bronco-alveolare
Il liquido bronco-alveolare è stato sottoposto ad accertamenti batteriologici e virologici mediante tecnica PCR per la ricerca di PRRSV, PCV2, SIV e ADV (Ganter et al., 1993, Kahlisch et al., 2009).

Sierologia
Per ciascun animale, su campioni di emosiero prelevati al momento dell'inclusione e a 5, 10 e 20 giorni, sono stati effettuati accertamenti sierologici volti a determinare la presenza di anticorpi nei confronti dei comuni virus respiratori (SIV, ADV, PRRS e PCV2), *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Quantificazione delle citochine pro-infiammatorie e delle proteine di fase acuta (APP) mediante ELISA
Nei campioni di BALF e di siero sono stati valutati mediante tecnica ELISA la presenza e i livelli delle seguenti citochine pro-infiammatorie (Huang et al., 1999) e proteine di fase acuta (acute phase proteins, APP; Heegaard et al., 1998, Hultén et al., 2003): TNF-α (Porcine TNF-α Cytoset -Invitrogen), IL-6 (Porcine IL-6 Quantikine ELISA - R&D Systems), IL-1β (Porcine IL-1β Quantikine ELISA - R&D Systems), Aptoglobina (HPT ELISA Kit - Uscn Life Science Inc.), LBP (LBP ELISA Kit - Hycult Biotech), CRP (CRP ELISA kit, Uscn Life Science Inc.).

Quantificazione dell'espressione genica di citochine mediante Real-Time PCR
L'RNA totale è stato estratto dalle cellule del BALF utilizzando TRI-Reagent (Ambion) secondo le istruzioni del produttore. All'RNA ottenuto (1 µg) portato ad un volume di 10 µl con H_2O DEPC sono stati aggiunti 10 µl di una miscela contenente dNTPs, random primers e trascrittasi inversa (High Capacity RNA-to-cDNA® kit - Applied Biosystems), e quindi sottoposti a retrotrascrizione secondo profilo termico indicato dal produttore. L'analisi dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-α) è stata effettuata mediante real-time PCR utilizzando termociclatore StepOne™ (Applied Biosystems, StepOne software v. 2.1). Il cDNA ottenuto (40 ng/20 µl) è stato amplificato usando master mix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e primer specifici (MWG) (Tabella 2).

Gene	Sequenze primer (forward - reverse)	Concentrazione (nM)
TNF-α (Meissonnier et al., 2008)	*for* 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'	300
	rev 5'-GGCGACGGGCTTATCTGA-3'	300
IL-10 (Royaee et al., 2004)	*for* 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	300
	rev 5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA-3'	300
IL-1β (von der Hardt et al., 2002)	*for* 5'-ATGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	300
	rev 5'-TTGTTGCTATCATCTCCTTGCAC-3'	300
IL-8 (Royaee et al., 2004)	*for* 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'	300
	rev 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'	300
IL-6 (Meissonnier et al., 2008)	*for* 5'-GGCAAAAGGGAAAGAATCCAG-3'	150
	rev 5'-GGATAAGCTGCAGTCACAGAACG-3'	150
MCP-1 (Che et al., 2011)	*for* 5'-CGGCTGATGAGCTACAGAAGAGT-3'	150
	rev 5'-GCTTGGGTTCTGCACAGATCT-3'	150
GAPDH (Primer Express)	*for* 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	300
	rev 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'	300

Tabella 2: Citochine indagate mediante real-time PCR con corrispettive sequenze primer e concentrazioni.
Table 2*: Cytokines evaluated by real-time PCR with corresponding primer sequences and concentrations.*

Il gene GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento secondo Fisher et al. (2006) e Ferrari et al. (2010). Il profilo termico della PCR ha previsto uno step di denaturazione a 95°C per 20 sec. e 40 cicli di amplificazione con denaturazione a 95°C per 3 sec. ed annealing/ estensione a 60°C per 30 sec. Un controllo negativo in assenza di cDNA stampo è stato incluso ad ogni corsa ed una curva di denaturazione (60-95°C) è stata inclusa per escludere amplificazioni aspecifiche dovute a dimeri di primer. I dati sono stati analizzati mediante metodo del delta-delta Ct ($\Delta\Delta$Ct) in cui i livelli di espressione di ciascuna citochina sono stati normalizzati con i livelli di GAPDH ed espressi come quantità relative.

Parametri di valutazione
Al fine di permettere una valutazione complessiva del decorso della malattia respiratoria sono stati considerati i seguenti parametri:
- Score clinico
- Mortalità (naturale, eutanasia) per malattia respiratoria
- Reazioni avverse al sito di iniezione
- Variazioni dell'evoluzione delle lesioni polmonari all'indagine radiografica
- Valutazione delle modificazioni delle singole citochine e delle proteine di fase acuta (Baarsch et al., 1995; Cho et al., 2002; Benga et al., 2009; Chen et al., 2011; Sjölund et al., 2011)
- Risultati delle indagini microbiologiche (Costa et al., 2011)

Analisi statistica
Le variabili demografiche, i fattori di rischio, i parametri vitali e i risultati delle indagini batteriologiche sono stati adeguatamente riassunti. Le variabili continue sono state riportate come medie, mediane e deviazione standard mentre le variabili discrete sono state riportate come frequenze e percentuali in opportune tabelle di contingenza. Per l'elaborazione statistica dei dati sono state utilizzate le procedure del Sistema di Analisi Statistiche (SAS)
Dopo aver valutato lo score clinico, i dati, espressi su scala ordinale e ripetuti nel tempo (ovvero i singoli punteggi di dispnea, tosse, depressione e scolo nasale), sono stati analizzati con modelli lineari per variabili categoriche e misure ripetute (procedura CATMOD del SAS) mentre le variabili continue sono state analizzate con modelli di ANOVA appropriati. Infine, per quanto riguarda la mortalità totale e per cause specifiche, i dati sono stati raggruppati in tabelle di frequenza ed analizzati con il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Mortalità
Come mostrato dalla tabella relativa alla mortalità (tabella 2), sono venuti a morte 4 soggetti.

ANIMALE	MORTALITÀ
1	SOPRAVVISSUTO
2	MORTO (giorno 11)
3	SOPRAVVISSUTO
4	MORTO (giorno 11)
5	SOPRAVVISSUTO
6	SOPRAVVISSUTO
7	MORTO (giorno 17)
8	SOPRAVVISSUTO
9	SOPRAVVISSUTO
10	MORTO (giorno 1)

Tabella 3: Mortalità durante il periodo di osservazione.
Table 3*: Mortality during the observation period*

Temperatura rettale e clinical score
Temperatura rettale e clinical score sono stati registrati ogni giorno durante le ore del mattino. Per quanto attiene ai risultati, si deve segnalare che in tutti i soggetti arruolati è stato osservato un clinical score ³ 3 e febbre persistente per la quasi completa durata della prova. I risultati non vengono mostrati a motivo dell'indifferenza che assumono nella valutazione critica dei risultati.

Indagini radiografiche
Al fine di valutare l'entità delle lesioni polmonari sono state eseguite indagini radiografiche nelle due proiezioni ortogonali LL e DV.
I risultati dello scoring delle lesioni parenchimali all'indagine radiografica sono di seguito riportate.

ANIMALE	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	0,0	1,0	16,0	0,0
2	0,0	5,0	5,0	*
3	0,0	4,0	14,0	2,0
4	0,0	13,0	14,0	*
5	0,0	6,0	9,0	4,0
6	0,0	1,0	8,0	3,0
7	0,0	1,0	13,0	*
8	0,0	1,0	2,0	1,0
9	0,0	5,0	3,0	3,0
10		*	*	*
TOTALE	**0,0**	**4,0**	**9,3**	**2,2**

Tabella 4: Risultato dei punteggi polmonari effettuati sui radiogrammi.
* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.
Table 4*: Lung scoring at RX imaging.*
* *Missing data refer to dead pigs.*

Si deve rilevare che al momento della comparsa della febbre e della dispnea l'immagine radiografica non permette di evidenziare alcuna lesione significativa e che l'entità maggiore del danno anatomico si rileva a circa 10 giorni dopo la comparsa della febbre. Dopo 20 giorni dalla comparsa della sintomatologia l'evoluzione favorevole della patologia negli animali sopravvissuti non ha ancora completato la fase di risoluzione, stante ancora la presenza di lesioni radiografiche di modica entità per gravità ed estensione ma pur sempre presenti.
Si riportano le immagini più significative in relazione ai punteggi ottenuti nei tempi considerati.

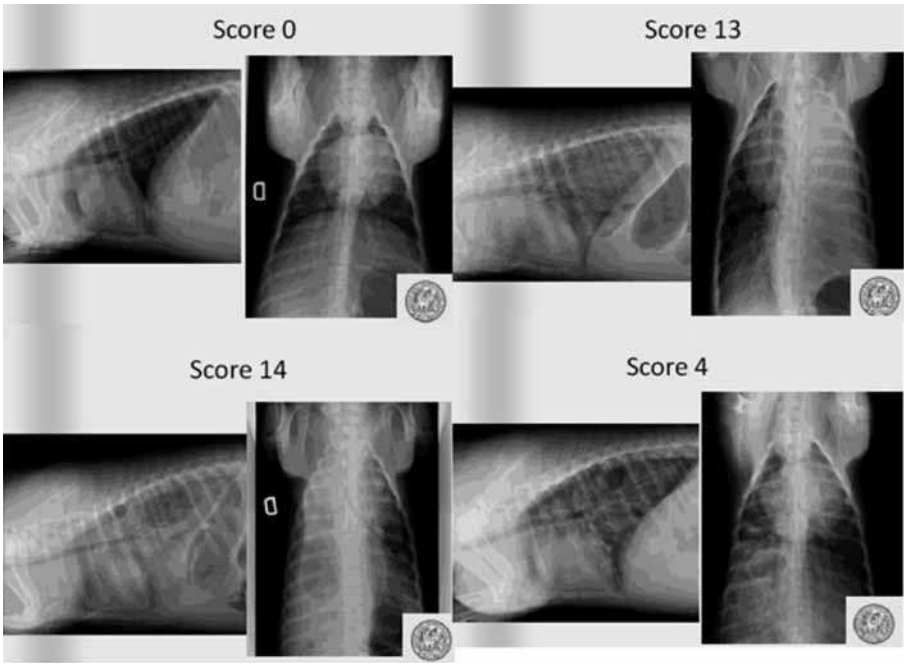


Figura 2: Proiezioni latero-laterale e ventro-dorsale del torace che evidenziano l'evoluzione delle modificazioni del pattern polmonare.
Figure 2*: RX latero-lateral and ventro-dorsal views of the thorax showing the progression of the pulmonary pattern changes.*

Pesi e incrementi ponderali
I pesi individuali e gli incrementi ponderali sono indicati analiticamente rispettivamente nelle tabelle 5 e 6.

ANIMALE	PESO			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	16,55	17,20	19,05	22,90
2	15,50	16,80	14,60	*
3	18,30	19,70	20,70	24,15
4	13,60	13,60	12,70	*
5	15,35	16,60	15,95	15,20
6	15,65	17,00	15,85	17,30
7	15,80	18,85	16,85	*
8	15,70	18,90	17,80	21,50
9	16,80	18,00	19,70	19,50
10	13,00	*	*	*
MEDIA	**15,63**	**17,41**	**17,02**	**20,09**

Tabella 5: Peso degli animali ai tre tempi considerati.
* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.
Table 5*: Individual body weight at the considered times.*
* *Missing data refer to dead pigs.*

ANIMALE	Da 0 a 5 GIORNI	Da 5 a 10 GIORNI	Da 10 a 20 GIORNI	Da 0 a 20 GIORNI
1	0,13	0,37	0,39	0,32
2	0,26	-0,44	*	*
3	0,28	0,20	0,35	0,29
4	0,00	-0,18	*	*
5	0,25	-0,13	-0,08	-0,01
6	0,27	-0,23	0,15	0,08
7	0,61	-0,40	*	*
8	0,64	-0,22	0,37	0,29
9	0,24	0,34	-0,02	0,14
10		*	*	*
MEDIA	**0,30**	**-0,08**	**0,19**	**0,19**

Tabella 6: Incrementi ponderali giornalieri (kg) negli intervalli temporali considerati.
***** I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.
Table 6*: Average daily weight gains (kg) in the considered periods.*
******* *Missing data refer to dead pigs.*

Esami microbiologici e sierologici
I risultati degli accertamenti microbiologici eseguiti sul liquido bronco-alveolare e degli accertamenti sierologici ottenuti ai tempi considerati sono riportati in tabella 7.

ANIMALE	INDAGINI MICROBIOLOGICHE PER APP			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
5	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
6	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
8	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (s.9)	POSITIVO (s.9)
10	NEGATIVO	*	*	*

Tabella 7: Risultati delle analisi batteriologiche sul BALF.
(s.9): positività verso APP sierotipo 9.
***** I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.
Table 7*: Microbiological findings from BALF.*
(s.9): positivity to APP serotype 9.
******* *Missing data from dead pigs.*

NUMERO	INDAGINI SIEROLOGICHE PER APP			
	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	*
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (§)
10	NEGATIVO	NEGATIVO	*	*

Tabella 8: Risultati delle indagini sierologiche su emosiero. (§) positività sierologica verso APP sierotipi 1, 9, 11.
* I dati mancanti si riferiscono a soggetti venuti a morte.
Table 8*: Results of the serological investigation. (§) seropositivity to APP serotypes 1, 9 and 11.*
** Missing data refer to dead pigs.*

Indagini anatomopatologiche
Sugli animali deceduti sono state effettuate indagini necroscopiche anatomopatologiche che hanno costantemente evidenziato quadri di pleuropolmonite a carattere necrotico-emorragico con evoluzione purulenta e siero-fibrinosa di gravità variabile costantemente ritenute causa dell'*exitus* dell'animale.

Livelli di citochine e proteine di fase acuta nel BALF e siero (ELISA)
I risultati delle determinazioni delle singole citochine e delle proteine di fase acuta (APP) sono indicati nelle tabelle 9, 10, 11 e 12. Nelle tabelle sono riportati anche i valori degli score polmonari radiografici al fine di permettere una migliore interpretazione dei dati. Per quanto attiene alla valutazione degli andamenti temporali di IL-1β (siero), IL-6, e TNF-α, l'analisi in ELISA non ha dato risultati attendibili per problemi di rilevabilità nelle matrici utilizzate.
Per quanto attiene alle proteine di fase acuta analizzate (CRP: C Reactive Protein, HP: aptoglobina, LBP: Lipopolisaccaride Binding Protein) e alla citochina pro-infiammatoria IL1-β, gli andamenti rilevati ai singoli soggetti confermano il ruolo di markers di monitoraggio dell'infiammazione (Fossum et al., 1998, Fossum et al., 2006) in quanto hanno manifestato un incremento e decremento nel tempo, ma non consentono di evidenziare differenze statisticamente significative tra i tempi considerati.
I risultati relativi a questi parametri indicatori dell'evoluzione infiammatoria confermano quanto evidenziato attraverso lo studio dei parametri clinici e radiografici sull'evoluzione della malattia respiratoria acuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Proteina C Reattiva (CRP)

	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
ANIMALI	RX	CRP BALF ng/ml	CRP SIERO ng/ml	RX	CRP BALF ng/ml	CRP SIERO ng/ml	RX	CRP BALF ng/ml	CRP SIERO ng/ml	RX	CRP BALF ng/ml	CRP SIERO ng/ml
1	0	0,48	0,78	1	3,02	3,36	16	9,84	2,45	0	0,24	1,59
2	0	0,65	1,02	5		4,31	5	2,83	5,74	morto		
3	0	0,52	0,69	4	6,04	4,80	14		2,73	2	0,65	1,05
4	0	0,48	0,57	12	3,59	4,67	14	3,54	2,49	morto		
5	0	0,70	1,86	6	5,63	5,42	9	4,52	2,94	4	0,64	2,99
6	0	0,41	0,13	1	1,22	3,80	8	0,87	3,98	3	0,31	1,40
7	0	0,48	0,46	1	2,48	3,24	13	6,99	2,59	morto		
8	0	0,37	1,52	1	1,00	4,10	2	0,32	2,59	1	0,74	1,72
9	0	0,24	1,61	5	0,21	1,54	3	3,09	6,21	3	0,37	0,61
10		0,45	1,96	morto			morto			morto		
Totale	**0**	**0,48**	**1,06**	**4,0**	**2,90**	**3,92**	**9,3**	**4,00**	**3,52**	**2,2**	**0,50**	**1,56**

Tabella 9: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di Proteina C Reattiva (CRP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.
Table 9*: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of C reactive protein (CRP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.*

Aptoglobina (HP)

	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
ANIMALI	RX	HP BALF µg/ml	HP SIERO µg/ml	RX	HP BALF µg/ml	HP SIERO µg/ml	RX	HP BALF µg/ml	HP SIERO µg/ml	RX	HP BALF µg/ml	HP SIERO µg/ml
1	0	4,57	2873,79	1	2,21	2155,94	16	5,35	5350,31	0	4,95	2676,99
2	0	6,12	2763,33	5	2,81	2781,69	5	4,79	4794,14	morto		
3	0	6,01	2840,46	4	3,65	2984,05	14	4,91	4912,33	2		2651,00
4	0	4,12	2089,12	12	4,27	2517,79	14	5,54	5538,84	morto		
5	0	4,87	2632,89	6	1,74	2569,14	9	4,37	4366,71	4	3,76	2651,18
6	0	6,34	2511,44	1	3,84	2765,93	8	2,54	2539,01	3	6,63	3145,01
7	0	1,43	2670,99	1	5,34	2731,15	13	5,42	5419,17	morto		
8	0	3,38	2311,58	1	3,43	2504,99	2	5,23	5231,12	1	3,55	3215,16
9	0	4,53	2679,89	5	4,42	3027,50	3	5,35	5350,31	3	5,77	2795,30
10		0,99	2698,47	morto			morto			morto		
Totale	**0**	**4,24**	**2607,20**	**4,0**	**3,52**	**2670,90**	**9,3**	**4,83**	**4833,50**	**2,2**	**4,93**	**2855,80**

Tabella 10: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di aptoglobina (HP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.
Table 10*: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of haptoglobin (HP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.*

Lipopolisaccaride Binding Protein (LBP)

	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
ANIMALI	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml	RX	LBP BALF ng/ml	LBP SIERO ng/ml
1	0	7,83	16500	1	26,86	29000	16	16,53	15000	0	16,30	4500
2	0	2,13	29500	5	6,88	23500	5	16,63	10250	morto		
3	0	6,35	17500	4	57,08	28150	14		11250	2	3,25	4950
4	0	4,79	4700	12	22,93	23000	14	13,95	12600	morto		
5	0	3,37	13000	6	19,69	25000	9		10050	4	3,07	5000
6	0	9,40	8500	1	25,24	16000	8	10,95	10300	3	7,05	4050
7	0	5,84	14650	1	20,55	22000	13	18,73	12020	morto		
8	0	1,35	7000	1	24,89	5000	2	13,38	13650	1	6,70	4990
9	0	5,12	7500	5	32,68	8000	3	13,09	14200	3	5,34	3000
10		0,98	8000	morto			morto			morto		
Totale	**0**	**4,70**	**12685,0**	**4,0**	**26,30**	**19961,1**	**9,3**	**14,80**	**12146,7**	**2,2**	**7,00**	**4415,0**

Tabella 11: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di lipopolisaccaride binding protein (LBP) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero.
Table 11*: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of lipopolisaccaride binding protein (LBP) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum.*

Interleuchina-1β (IL-1β)

	GIORNO 0			GIORNO 5			GIORNO 10			GIORNO 20		
ANIMALI	RX	IL-1β BALF pg/ml	IL-1β SIERO pg/ml	RX	IL-1β BALF pg/ml	IL-1β SIERO pg/ml	RX	IL-1β BALF pg/ml	IL-1β SIERO pg/ml	RX	IL-1β BALF pg/ml	IL-1β SIERO pg/ml
1	0	0	–	1	29,20	–	16	0	–	0	108,37	–
2	0	1,67	–	5			5	1878,21	–	morto		
3	0	0	–	4	106,48	–	14			2	0	–
4	0	79,74	–	12	234,09	–	14	79,50	–	morto		
5	0	149,03	–	6			9	1813,63	–	4	1289,37	–
6	0	0	–	1	531,95	–	8	314,10	–	3	0	–
7	0	0	–	1			13	7,23	–	morto		
8	0	0	–	1	1,66	–	2	169,78	–	1	578,97	–
9	0	0	–	5			3	0	–	3	182,47	–
10	0	0	–	morto			morto			morto		
Totale	**0**	**23,00**	–	**4**	**180,70**	–	**9,3**	**532,8**	–	**2,2**	**359,90**	–

Tabella 12: Scoring delle lesioni polmonari (RX) e livelli di interleuchina-1β (IL-1β) nel liquido bronco-alveolare (BALF) e nel siero. – Livello non determinato.
Table 12*: Scoring of the pulmonary lesions (RX) and levels of interleukin-1β (IL-1β) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and serum. – Level not determined.*

Livelli di espressione di citochine nelle cellule del BALF (real-time PCR)
L'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie (IL-1β, IL-8, IL-6, MCP-1, TNF-α) ha evidenziato come lo stato infiammatorio sia aumentato a partire da 5 giorni ed abbia avuto intensità massima a 10 giorni, per poi diminuire a 20 giorni (tabella 13). Nello specifico, in alcuni animali, soprattutto i livelli di IL-1β, IL-8 e TNF-α hanno mostrato un incremento tra 10 e 20 giorni. Il permanere di livelli elevati di citochine pro-infiammatorie a 20 giorni testimonia come l'evoluzione e la eventuale risoluzione dell'infezione si sia dimostrata variabile in relazione alla diversa reattività del singolo animale ed indipendentemente dall'effetto della terapia antibiotica, che comunque appare insufficiente al miglioramento del quadro clinico e biochimico oltre che radiografico.
Le modificazioni dell'espressione della citochina immunomodulatrice negativa IL-10 sono apparse più variabili; comunque è stata osservata una riduzione di espressione in vari animali a 10 giorni, in parallelo all'aumento delle citochine pro-infiammatorie, in particolare di IL-1β, IL-8 e MCP-1.

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-1β	1		1.37	9.43	5.33
	2	1,00	0,23	23,32	morto
	3	3,22	4,21		
	4	6,00	4,60	4,96	morto
	5	4,98		89,26	80,76
	6	1,98	2,71	192,37	
	7	1,61	3,57	2,77	morto
	8	1,81	1,16	8,97	77,41
	9	1,38	1,93		53,11
	10		morto	morto	morto

	ANIMALI	GIORNO 0	GIORNO 5	GIORNO 10	GIORNO 20
IL-8	1		0.82	15,05	9,62
	2	1,00	1,95	62,05	morto
	3	1,55	6,49		
	4	3,58	1,77	27,27	morto
	5	15,91		95,10	187,85
	6	3,93	5,24	377,81	
	7	0,45	4,08	3,09	morto
	8	7,93	21,37	20,97	251,02
	9	4,37	0,64		112,74
	10		morto	morto	morto

IL-6	1		0.11	2.38	0.03
	2	1,00	0,51	3,64	morto
	3	0,21	10,33		
	4	0,42	0,20	1,35	morto
	5	0,85		10,26	1,65
	6	0,35	2,44	9,41	
	7	0,29	1,31	1,28	morto
	8	0,06	0,83	4,17	8,81
	9	4,90	0,32		1,62
	10		morto	morto	morto

MCP-1	1		0.60	4.15	0.14
	2	1.00	2.06	11.02	morto
	3	0,33	4,16		
	4	0,07	4,44	0,06	morto
	5	6,83		12,29	4,76
	6	5,06	10,21	3,61	
	7	0,03	2,82	0,15	morto
	8	0,98	4,37	7,23	9,66
	9	0,33	0,15		8,70
	10		morto	morto	morto

TNF-α	1		0,58	4,01	0,65
	2	1,00	0,32	1,89	morto
	3	1,47	0,39		
	4	1,57	0,83	5,07	morto
	5	1,93		6,27	10,81
	6	1,37	0,64	9,59	
	7	0,55	1,80	4,31	morto
	8	1,93	0,56	2,99	10,20
	9	1,28	0,62		6,64
	10		morto	morto	morto

IL-10	1		0,40	0,28	0,23
	2	1,00	4,47	2,62	morto
	3	1,76	2,60		
	4	1,49	0,85	1,04	morto
	5	0,18		8,60	2,22
	6	0,45	1,92	6,28	
	7	0,84	1,24	0,47	morto
	8	0,12	1,76	1,30	4,46
	9	0,16	0,40		3,37
	10		morto	morto	morto

Tabella 13: Livelli di espressione genica delle citochine pro-infiammatorie nel liquido bronco-alveolare (BALF).
Table 13*: Levels of pro-inflammatory and immune cytokine gene expression in broncho-alveolar lavage fluid (BALF).*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
I risultati delle indagini cliniche, microbiologiche, radiologiche e biochimico-cliniche relative ai markers infiammatori sia nel sangue che nel liquido bronco-alveolare (BALF)

hanno evidenziato un andamento pressoché sovrapponibile in tutti i soggetti considerati. In particolare, si è rilevato che il decorso clinico della malattia respiratoria osservata nella totalità dei soggetti considerati ha visto una fase iniziale di acuzie associata a lesioni polmonari radiologicamente riferibili a quadri di polmonite anche ad interessamento pressoché completo di un intero polmone, con una successiva evoluzione che se da un lato è stata caratterizzata dalla pressoché completa remissione dei sintomi, dall'altra ha visto la persistenza delle lesioni ancora al 20° giorno di osservazione. Si deve infatti sottolineare che, al termine del periodo di osservazione (20 giorni), alcuni soggetti denunciavano ancora la presenza di lesioni radiografiche che, seppur di modica entità (score <5), deponevano per una non completa *restituito ad integrum* della porzione parenchimale interessata dal processo infiammatorio. Per quanto attiene all'evoluzione dei pesi e degli incrementi ponderali giornalieri degli animali affetti dalla malattia respiratoria, si conferma la significativa influenza negativa dello stato patologico sui parametri della crescita tanto che dal 5° al 10° giorno di osservazione gli animali hanno denunciato un decremento ponderale giornaliero medio di 80 grammi. Su tutto il periodo di osservazione gli animali hanno avuto, mediamente, un incremento ponderale giornaliero di soli 190 grammi.

Ciò merita di essere considerato nell'ambito della valutazione della durata di un trattamento antibatterico. In effetti, i dati che emergono da questo studio supportano e corroborano quanto già ipotizzato a riguardo della durata del trattamento antibatterico in corso di polmonite o pleuropolmonite del maiale, segnatamente che la terapia antibatterica dovrebbe essere prevista di durata non inferiore a 14 giorni, analogamente a quanto già ampiamente applicato nella pratica clinica di altre specie animali soprattutto d'affezione (cane e gatto) oltre che nell'uomo. Dai dati ottenuti, infatti, si evince che il trattamento antibatterico, anche precocemente applicato come in questo caso, ossia alla comparsa dei prodromi della malattia, se non prolungato ben oltre cinque giorni di copertura antibatterica correntemente applicata nella pratica di allevamento, non è in grado di favorire la guarigione anatomo-funzionale e il re-isolamento del microrganismo così che i quadri radiografici depongono, in alcuni casi, per un'evoluzione cronica caratterizzata dalla persistenza delle lesioni anche a 20 giorni dall'esordio ella malattia.
La mortalità elevata, riconducibile a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, come confermato dagli accertamenti batteriologici eseguiti sul BALF, dalla sieroconversione verso APP e dalle lesioni anatomopatologiche macroscopiche suggestive di pleuropolmonite emorragico-fibrinosa nei soggetti deceduti, sottolinea che l'infezione da parte di un sierotipo a medio-alta patogenicità, quale è stata l'infezione dimostrata nel presente studio, può provocare la morte degli animali anche se opportunamente sottoposti a trattamento antibatterico precoce e mirato per sensibilità qualora non sia sufficientemente prolungato. La durata della terapia antibatterica e la relativa attività antibiotica nella biofase interessata dal processo infettivo-infiammatorio devono prevedere un effetto protratto nel tempo, poiché la sterilizzazione/guarigione microbiologica non avvengono in fase precoce quanto piuttosto in tempi successivi. Infatti, la maggior proporzione di soggetti il cui BALF è risultato positivo all'esame batteriologico si è rilevata al 20° giorno di osservazione, fatto che avvalora ulteriormente l'evidenza che il trattamento precoce, seppur indispensabile, qualora non protratto nel tempo non è in grado di operare una "sterilizzazione" microbiologica, requisito essenziale per la guarigione e per l'arresto dell'evoluzione cronica spontanea della patologia pleuro-polmonare.
I markers infiammatori, valutati mediante ELISA nel BALF e nel siero (CRP, HP, LBP, IL-1β) così come mediante real-time PCR nelle cellule del BALF (IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α), hanno mostrato andamenti di incremento e successivo decremento nel tempo in

associazione all'evoluzione della malattia respiratoria, pur con variazioni individuali e con tipologia di andamento differente a seconda delle caratteristiche dei diversi marcatori. Anche se caratterizzato da maggior variabilità, l'andamento della citochina immunoregolatrice negativa IL-10 si è modificato in relazione allo stato infiammatorio, a testimonianza di una regolazione concertata tra meccanismi di reattività cellulare in presenza di infezione che supporta quanto sopra rilevato e discusso in ordine alle modificazioni anatomo-funzionali.

Le indagini preliminari condotte in questo studio permettono di concludere che l'evoluzione della malattia respiratoria acuta sostenuta da *Actinobacillus pleuropneumoniae* occupa uno spazio temporale dell'ordine di grandezza delle settimane (non inferiore a 15-21 giorni) e che il trattamento antibatterico, anche qualora applicato precocemente, ovvero all'esordio delle manifestazioni cliniche, se di durata limitata alla prima settimana, non è sufficiente a favorisce la guarigione microbiologica e anatomo-funzionale della sede pleuro-polmonare, dando luogo ad una evoluzione protratta nel tempo in cui le lesioni anatomiche, seppur di entità ridotta rispetto alla fase di acuzie, permangono a sostegno di una evoluzione subacuta-cronica e dello scadimento delle condizioni generali dell'animale, soprattutto per quanto attiene agli incrementi ponderali giornalieri. Il fatto che il microrganismo implicato venga isolato con frequenza crescente col passare dei giorni dal momento dell'infezione naturale impone che la terapia antibiotica della polmonite acuta, soprattutto quando manifesta in associazione a quadri di pleuro-polmonite, venga protratta per almeno due settimane, onde permettere la guarigione microbiologica, premessa per una evoluzione favorevole anche in termini anatomici e funzionali.

RINGRAZIAMENTI
La ricerca è stata condotta grazie al finanziamento di Pfizer Animal Health-Italia a favore del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli Studi di Parma.

BIBLIOGRAFIA
Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K., Murtaugh M.P., 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Infection and Immunity 63, 3587-3594.

Benga L., Hoeltig D., Rehm T., Rothkoetter H.J., Pabst R., Valentin-Weigand P., 2009. Expression levels of immune markers in Actinobacillus pleuropneumoniae infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms". BMC Veterinary Research 5, 13.

Bosse T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R., 2002. Actinobacillus pleuropneumoniae: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes and Infection 4, 225-235.

Che T.M., Johnson R.W., Kelley K.W., Van Alstine W.G., Dawson K.A., Moran C.A., Pettigrew J.E., 2011. Mannan oligosaccharide modulates gene expression profile in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Animal Science 89, 3016-3029.

Chen Z.W., Chien M.S., Chang N.Y., Chen T.H., Wu C.M., Huang C., Lee C., 2011. Mechanisms underlying Actinobacillus pleuropneumoniae exotoxin ApxI induced expression of IL-1β, IL-8 and TNF-α in porcine alveolar macrophages. Veterinary Research 42, 25.

Cho W.S. e Chae C., 2002. Expression of nitric oxide synthase-2 and tumor necrosis factor-α in swine naturally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Veterinary Pathology 39, 27-32.

Costa G., Oliveira S., Torrison J., Dee S., 2011. Evaluation of Actinobacillus pleuropneumoniae diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs. Veterinary Microbiology 148, 246-251.

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. Research in Veterinary Science 90, 64-71.

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. Immunology 101, 378-387.

Fossum C., 1998. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig". Domestic Animal Endocrinology 15, 439-444.

Fossum C., Wattrang E., Fuxler L., Jensen K.T., Wallgren P., 1998. Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine - a possible role for serum interleukin-6. Veterinary Immunology and Immunopathology 64, 161-172.

Ganter M., Kipper S., Schottger-Wegener H., Beckmann G., Bunka S., 1993. Diagnosis of pneumonitis in living pigs by bronchoalveolar lavage. Berliner & Munchner Tierurztliche Wochenschrift 1116, 330-333.

Heegaard P., Klausen J., Nielsen P., Gonzalez-Ramon N., Pineiro M., Lampreave F., Alava M., 1998. The porcine acute phase response to infection with Actinobacillus pleuropneumoniae. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. Comparative Biochemistry and Physiology 119, 365-373.

Huang H., Potter A.A., Campos M., Leighton F.A., Willson P.J., Haines D.M., Yates W.D., 1999. Pathogenesis of porcine Actinobacillus pleuropneumonia: roles of proinflammatory cytokines. Canadian Journal of Veterinary Research 63, 69-78.

Hultén C., Johansson E., Fossum C., Wallgren P., 2003. Interleukin-6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Veterinary Microbiology 95, 75-89.

Kahlisch D., Buettner F.F., Naim H.Y., Gerlach G.F., 2009. Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to Actinobacillus pleuropneumoniae infection. Veterinary Research 40, 60.

Lauritzen B., Lykkesfeldt J., Skaanild M.T., Angen Ø., Nielsen J.P., Friis C., 2003. Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment: an experimental model of porcine Actinobacillus pleuropneumoniae infection. Research in Veterinary Science 74, 261-270.

Marois C., Gottschalk M., Morvan H., Fablet C., Madec F., Kobisch M., 2009. Experimental infection of SPF pigs with Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 9 alone or in association with Mycoplasma hyopneumoniae. Veterinary Microbiology 135, 283-291.

Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P., 2011. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. Veterinary Journal. Dicembre 17.

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. Toxicology and Applied Pharmacology 231, 142-149.

Royaee 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. Veterinary Immunology and Immunopathology 102, 199-216.

Sjölund M., Fossum C., Martín de la Fuente A.J., Alava M., Juul-Madsen H.R., Lampreave F., Wallgren P., 2011. Effects of different antimicrobial treatments on serum acute phase responses and leucocyte counts in pigs after a primary and a secondary challenge infection with Actinobacillus pleuropneumoniae. Veterinary Record 169, 70.

Thacker E., 2006. Lung inflammatory responses. Veterinary Research 37, 469-486.

GENOTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* ISOLATI IN ITALIA ATTRAVERSO IL SEQUENZIAMENTO MULTILOCUS (MULTILOCUS SEQUENCE TYPING)

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING ANALYSIS OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE ISOLATES FROM ITALIAN FARMS

P. BONILAURI[1], E. CARRA[1], G. BIASI[1], F. BERGAMINI[1], F. CORPUS[1], C.MAGISTRALI[2], A. LUPPI[1] , Y. GHERPELLI[1], G. RUGNA[1], L. CUCCO[2], M. DOTTORI M[1], G. MERIALDI[1].

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER)*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Umbria e delle Marche (IZSUM)*

Parole chiave: *Brachyspira hyodysenteriae, MLST, Italia, Dissenteria emorragica, epidemiologia molecolare, sensibilità agli antimicrobici*

Key words: *Brachyspira hyodysenteriae, MLST, Italy, Swine dysentery Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility*

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di applicare la tipizzazione tramite Multilocus sequence typing (MLST) a 52 ceppi *Brachyspira hyodysenteriae* provenienti da 43 differenti aziende italiane localizzate in 14 province del Nord e del Centro Italia, isolati nel periodo di tempo compreso tra il 2003 ed il 2011. Per 47 di questi ceppi era noto il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC) nei confronti delle pleuromutiline tiamulina e valnemulina. MLST applicata a 7 loci (*adh, alp, est, gdh, glpK, pgm, thi*) di *B. hyodysenteriae* ha permesso di confrontare la realtà italiana con i 111 ceppi tipizzati utilizzando lo stesso metodo a livello mondiale. Dodici profili allelici (ST) sono stati individuati tra i ceppi italiani, di cui 11 nuovi e uno precedentemente descritto in ceppi isolati in Germania e Belgio. Un significativo allontanamento dell'equilibrio genetico è stato rilevato tramite il calcolo dell'indice di associazione I_A, confermando la struttura prevalentemente clonale delle popolazioni di ceppi di *B. hyodysenteriae*. I 12 ST individuati in Italia possono essere raggruppati in 4 gruppi clonali (Cc) e 2 ST restano come singolarità non raggruppabili. L'analisi di questi gruppi clonali nei confronti dei ceppi sequenziati a livello mondiale è dettagliata nel testo. Relativamente al profilo di suscettibilità alle pleuromutiline, nessun Cc permette di separare ceppi sensibili e ceppi a ridotta sensibilità in modo statisticamente significativo. Il protocollo di tipizzazione utilizzato è risultato particolarmente robusto e sufficientemente discriminatorio da poter essere utilizzato per lo studio della epidemiologia molecolare e della diversità dei ceppi di *B. hyodysenteriae* presenti sul territorio italiano.

Summary

The aim of this study was to apply the multilocus sequence typing (MSLT) scheme to 52 *Brachyspira hyodysenteriae* italian strains isolated between 2003 and 2011. The MIC value for pleuromulitins (tiamulin and valnemulin) was previously determined in

47 strains out of 52. Seven loci were sequenced (*adh, alp, est, gdh, glpK, pgm, thi*) and all the locus were kept in data analysis allowing the comparisons of the italian isolates with the 111 isolates in the PubMLST data base (http://pubmlst.org). Based on MLST results, the isolates were allocated in 12 sequence types (STs) of which 11 had not been reported before and one (ST52) was previously reported in PubMLST. Significant linkage disequilibrium was found ($p<0.000$) both considering number of isolates ($I_a=1.547$) and number of STs ($I_a=0.258$). Four Clonal complex (Cc) were individuated by BURST analysis, the possible association of these complexes with strain sequenced worldwide is reported in the text. No statistically significant association was observed with single STs or Cc and reduced sensitivity to pleromutilins, although the majority (17 out of 26) of the strains with reduced susceptibility were classified in Cc2. This study confirms MLST as reliable tool for investigation of diversity of *B. hyodysenteriae* strains. The application of this method at farm level could lead to better understanding of the epidemiology of the infection, including sources and patterns of introduction, potentially providing support to more effective control and eradication strategies.

INTRODUZIONE

Brachyspira hyodysenteriae (specie fortemente b emolitica) è agente eziologico della Dissenteria emorragica del suino (SD) (Taylor et al. 1971). Questa malattia enterica infettiva e trasmissibile, si manifesta prevalentemente nelle fasi di magronaggio ed ingrasso. Clinicamente è caratterizzata da una diarrea muco-emorragica che conduce i soggetti colpiti a perdita di peso, disidratazione e cachessia e, nei casi più gravi, può avere esito letale (Wannemueler, 1993). La comparsa di ceppi a ridotta sensibilità nei confronti di vari antimicrobici, fra cui le pleuromutiline tiamulina e valnemulina (Karlsson et al. 2004, Duinhof et al. 2008) considerate farmaci di elezione per la terapia della SD, è stata segnalata ovunque nel mondo. Anche in Italia questo fenomeno è stato descritto da tempo (Bonilauri et al. 2004, Merialdi et al. 2006, Magistrali et. al. 2010). La tipizzazione molecolare di *Brachyspira hyodysenteriae*, finalizzata allo studio della sua epidemiologia, può aggiungere informazioni utili per determinare le vie di trasmissione di questi microrganismi e individuare possibili fonti di ceppi particolarmente pericolosi, data la loro ridotta sensibilità ai trattamenti antibatterici. Vari approcci sono stati utilizzati per tipizzare i ceppi di *B. hyodysenteriae*: dalla tipizzazione sierologica (Baum e Joens 1979), che risente della riconosciuta difficoltà di ottenere l'espressione degli antigeni lipopolisaccaridici in modo riproducibile, alla tipizzazione con differenti tecniche molecolari quali REA (DNA restriction endonuclease analysis), RAPDs (DNA Random amplification of polymorphism analysis), RFLP (DNA restriction fragment polymorphism analysis), PFGE (Pulsed field gel elettroforesis), MLEE (multilocus enzyme elettrophoresis), MLVA (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) e, infine, MLST (multilocus sequence typing analysis) che più delle precedenti possiede elevato potere discriminatorio ed alta riproducibilità tra laboratori. Quest'ultima metodica permette di tipizzare i differenti ceppi batterici attraverso il sequenziamento di alcuni, di solito 5 o 7, loci genici e la loro classificazione in differenti alleli (Maiden et al. 1998; Chan et al. 2001). La composizione di ogni ceppo, rispetto alla presenza di un determinato allele in ognuno dei loci sequenziati, determina il suo profilo in modo univoco. Relativamente alla tipizzazione di *B. hyodysenteriae,* questa tecnica è stata descritta per la prima volta da Råsbäck et al. (2007) ed applicata su un numero notevole di ceppi di da La et al. (2009). Nessun ceppo italiano è stato tipizzato con questa

tecnica prima del presente studio.
Scopo del presente lavoro è quindi riportare i risultati dell'applicazione della MLST su ceppi italiani di cui era stato precedentemente determinata la sensibilità *in vitro* nei confronti delle pleuromutiline.

MATERIALI E METODI

Ceppi

Cinquantadue ceppi di *B. hyoyisenteriae* sono stati raccolti da 43 differenti aziende italiane localizzate in 14 province del Nord e del Centro Italia, nel periodo di tempo compreso tra il 2003 ed il 2011. Per 47 di questi ceppi era stato precedentemente determinato il valore di Minima Concentrazione Inibente delle pleuromutiline (tiamulina e valnemulina). Sono stati classificati come ceppi a ridotta sensibilità quelli che presentavano MIC > 1µg/ml nei confronti di almeno uno dei due farmaci. Tutti i ceppi, sono conservati congelati nella collezione batterica dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I ceppi italiani sono stati confrontati con i 111 ceppi attualmente presenti nella banca dati MLST pubblicata sul sito web PubMLST (http://pubmlst.org/) e precedentemente analizzati da La et al. (2009).

Estrazione DNA

L'estrazione del cromosoma batterico è avvenuta tramite l'utilizzo del kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN GmbH, Germany) applicando il protocollo per batteri gram negativi. Un ml di sospensione batterica concentrata 10^6-10^7 Mcfarland è stato centrifugato a 5000 x g e dal pellet di cellule ottenuto è stata eseguita l'estrazione del cromosoma batterico.

Multilocus sequence typing

Per ciascun ceppo sono stati sequenziati 7 degli 8 *locus* genici descritti da Råsbäck et al. (2007), codificanti rispettivamente per l'enzima alcool deidrogenasi (*adh*), fosfatasi alcalina (*alp*), esterasi (*est*), glutammato deidrogenasi (*gdh*), glucosio chinasi (*glpk*), fosfoglucomutasi (*pgm*), acetil-CoA acetiltransferasi (*thi*). Nelle reazioni di PCR sono stati impiegati i primers descritti da Råsbäck et al. (2007), tra di essi la sola coppia ADH-F206 e ADH-R757 per il locus *adh* e la coppia ALP- F354 e ALP-R1262 per il locus *alp*. Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 30 µl impiegando la master mix GoTaq® Hot Start Colorless (Promega). In ogni set di campioni sottoposti ad amplificazione sono stati inclusi un controllo positivo rappresentato dal ceppo di campo di Brachyspira *hyodysenteriae* MO371/2011 e da acqua bidistillata come controllo negativo. Le condizioni di PCR impiegate erano quelle descritte da Råsbäck et al. (2007): 95°C per 2', seguito da 33 cicli a 95°C per 30'', 50°C per 30'', 72°C per 1', estensione finale di 2' a 72°C prima del raffreddamento a 4°C. I prodotti di PCR sono stati purificati mediante kit AgenCourt® Ampure® XP secondo le istruzioni previste dal produttore. Gli amplificati purificati sono stati sequenziati in accordo con le istruzioni del kit CEQ DTCS with Quick Start Kit Beckman Coulter (USA) mediante sequenziatore automatico CEQ 8000 Beckman Coulter (USA) impiegando gli stessi primers di PCR, ad eccezione del locus *pgm* per il quale la sequenza consensus è stata ottenuta dall'allineamento tra la sequenza ottenuta con il primer PGM-F172 e un primer di nuovo disegno PGM-F390 (5'-TATACTCCTATTCATGGTTCCG-3'). I risultati grezzi sono stati analizzati mediante i moduli "Sequencing" e "Investigator" del software CEQ 8000 (versione 8.0) in dotazione con lo strumento.
Per ciascun locus genico è stato creato l'allineamento tra le sequenze ottenute e le rispettive sequenze del ceppo originale WA1 di *B. hyodysenteriae,* disponibile in PubMLST,

mediante l'applicazione di Clustal W del software BioEdit versione 7.08 (Tom Hall, Ibis Biosciences). Impiegando lo stesso software, le sequenze allineate sono state accorciate alle dimensioni richieste dalla successiva analisi MLST a rispettivamente 345bp per il locus *adh* (nucleotide 303-647), 648bp per il locus *alp* (nucleotide 460-1107), 503 bp per il locus *est* (nucleotide 288-790), 415 bp per il locus *gdh* (nucleotide 634-1049), 687bp per il locus *glpk* (nucleotide 320-1006), 744bp per il locus *pgm* (nucleotide 297-1040) e 745bp per il gene *thi* (nucleotide 224-968).

Analisi dei dai genetici

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quanto disponibile in banca dati MLST (http://pubmlst.org/analysis/) per determinare la conformazione allelica di ciascun ceppo nei confronti dei 7 geni sequenziati. Ad ogni sequenza è stato attribuito un unico allele, identificato con un numero. Qualora siano stati sequenziati alleli con piccole differenze rispetto a quanto presente in banca dati a questi è stato *presuntivamente* assegnato il numero allelico più vicino a quello precedentemente depositato.

Il profilo allelico di ciascun ceppo è quindi rappresentato da una serie di 7 numeri corrispondenti al singolo allele ottenuto dall'analisi della sequenza dei 7 loci. Ad ogni ceppo è stato assegnato un numero (ST) dall'inglese *sequence type*. A differenti ceppi con il medesimo profilo allelico è stato assegnato il medesimo ST; in questo caso i due ceppi sono stati considerati identici. Le sequenze ottenute sono state inviate per l'inserimenti in banca dati PubMLST sul sito ospitato dai server dalla Oxford University (http://pubmlst.org/); al termine delle procedute di controllo previste, alle sequenze mostranti piccole differenze rispetto a quanto precedentemente sequenziato a livello mondiale, potranno essere assegnati numeri allelici differenti.

Sulla base dei risultati ottenuti, ed in attesa della conferma dei ST da parte della banca dati PubMSLT, i ceppi italiani sono stati rappresentati da un dendrogramma tramite il metodo UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) utilizzando il sistema *bootstrap* con 1000 repliche attraverso il programma START2 (Jolley et al 2001). Gli isolati italiani sono stati raggruppati in complessi clonali (Cc) in modo che ogni ST combaci con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci tramite analisi BURST. Lo stesso criterio è stato utilizzato per ripetere l'analisi coinvolgendo tutti i ceppi disponibili in banca dati, usando la versione elettronica eBURST (Feil et al. 2004) disponibile all'interno del sopraccitato programma START2. Il tasso di disequilibrio della popolazione dei 52 ceppi italiani è stato stimato attraverso il calcolo dell'indice di Associazione (I_A) utilizzando il metodo classico (Smith et al. 1993), sempre attraverso l'utilizzo del software START2.

RISULTATI

I 52 ceppi di *B. hyodysenteriae* risultano distribuiti in 12 ST, di cui 11 nuovi e uno precedentemente descritto (ST52). La frequenza allelica per i 7 loci sequenziati, varia tra 6 per il gene THI e 2 per i geni ADH e EST. Il ST più rappresentato è il 76 che racchiude 16 ceppi al suo interno (30.8%), seguito dal ST 72 con 9 ceppi (17.3%), dal ST 52 con 8 ceppi (15.4%), dagli ST 69 e 74 con 5 ceppi (9.6%) ciascuno, dal ST 68 con 3 ceppi (5.8%) e da 6 ulteriori ST in cui cade un solo ceppo. Considerando il numero di ceppi l'indice di associazione (I_A) risulta uguale a 1.547 mentre, considerando il numero di ST individuati, questo indice assume il valore di 0.258, con una distanza dall'equilibro genetico statisticamente significativa ($p<0.000$) in entrambe le analisi.

Nella figura 1 è rappresentato il dendrogramma che mostra le relazioni ottenute tra i 52 ceppi italiani genotipizzati. Tramite analisi BURST, i 12 differenti ST individuati sono suddivisi in tutto in 4 gruppi clonali da cui rimangono esclusi 4 ceppi riportanti i profili ST68 (3 ceppi) e ST75 (1 ceppo), che appaiono come singolarità..

Per 6 aziende erano disponibili ceppi isolati in differenti campionamenti successivi, in particolar modo in una azienda erano presenti 4 ceppi raccolti tra il 2006 ed il 2011 e tutti questi ceppi sono stati tipizzati come ST76. Analogamente, 3 ceppi provenienti da un'altra azienda, di cui 2 isolati 2010 e 1 nel 2011, sono risultati tutti ST 52. In altre 2 aziende erano disponibili 2 ceppi isolati entrambi nel 2006, nel primo caso, ed entrambi nel 2009 nel secondo caso, a distanza di pochi mesi l'uno dall'altro. Anche per queste 2 aziende, lo stesso ST è stato rilevato in queste analisi ripetute. In 1 caso, 2 ceppi isolati nel medesimo anno, 2006, dalla stessa azienda, hanno mostrato profili allelici differenti, ST77 e ST74. Questi due ceppi, vengono comunque raggruppati all'interno dello stesso gruppo clonale, per cui è presumibile che siano strettamente imparentati tra loro. Infine, in una azienda dove sono stati tipizzati 2 ceppi a distanza di un anno l'uno dall'altro, i due ceppi pur avendo lo stesso profilo allelico (ST76), hanno mostrato differente sensibilità alle pleuromutiline.

Relativamente ai profili di sensibilità alle pleuromutiline, nessun gruppo clonale individuato permette di separare ceppi sensibili da ceppi a ridotta sensibilità in maniera statisticamente significativa, anche se all'interno del Cc2, ricadono la maggior parte (17/26) dei ceppi con MIC>1 mcg/ml per almeno una tra tiamulina e valnemulina. Nel Cc2 ricadono comunque anche 5 ceppi sensibili ad entrambi i farmaci. Singolarmente, tutti e 5 questi ceppi sensibili ad entrambe le molecole, ricadono nel ST76 (ST più rappresentato del gruppo), mentre gli altri 3 ST presenti nel gruppo, ST77 (un ceppo), ST74(5 ceppi) sono risultati tutti a ridotta sensibilità per almeno una delle due molecole.

Relativamente alla distribuzione geografica dei ceppi tipizzati, non è possibile rilevare nessuna relazione spaziale associabile ai differenti ST od ai differenti Cc.

Nella tabella 2 è riportata la distribuzione dei ceppi italiani tipizzati sulla base di quanto descritto.

Ripetendo l'analisi di BURST considerando oltre ai 52 ceppi italiani sequenziati i 111 ceppi attualmente presenti nella banca dati MLST (http://pubmlst.org/) e precedentemente analizzati da La et al. (2009), si ottengono 11 Cc cui si aggiungono 13 singolarità non raggruppabili (figura 2). Il gruppo clonale più grande è il Cc 9 che racchiude al suo interno 22 ST (32 ceppi) ed in questo gruppo ricadono esclusivamente ceppi australiani. A questo segue per numerosità il Cc 1 con 17 ST (43 ceppi) in cui ricadono sia ceppi isolati in Europa (Germania, Belgio e Italia) e che tra di loro formano un sotto-raggruppamento (ST51,52,70 e 71), sia ceppi di origine Australiana e Nord Americana, che a loro volta formano un sotto- raggruppamento. Il Cc2 racchiude al suo interno ceppi italiani (ST74, 76 e 77) strettamente imparentati con un ceppo di provenienza del Regno Unito (ST10) isolato nel 1970. I 6 ceppi raggruppati nel Cc4 dall'analisi dei soli ceppi italiani vengono accomunati ad un ceppo di origine Canadese isolato nel 1989 dall'analisi comprensiva di tutti i ceppi attualmente sequenziati. I 3 ceppi ST68, classificati come singolarità nell'analisi di BURST ottenuta confrontando i soli ceppi italiani, vengono raggruppati con un isolato in Svezia nel 2003, mentre il ceppo ST75 resta una singolarità anche confrontato con tutti i ceppi attualmente disponibili in banca dati.

Tabella 1: Ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* tipizzati tramite MSLT, con il numero identificativo (ID), l'origine aziendale (Origin), l'anno di isolamento (year), il gruppo clonale di appartenenza (Cc), il profilo allelico, sequence type (ST) e la sensibilità alle pleuromutiline.

Table 1: *Brachyspira hyodysenteriae* strain number (ID), origin, province of farm location, year of strain isolation, Clonal complex, sequence type and pleuromutilins susceptibility.

ID	Origin	Province	year	Cc	ST	pleuromutilins susceptibility[a]
155	Farm17	lo	2006	1	70	s
30i	Farm28	pg	2005	1	52	s
293	Farm29	pg	2009	1	52	r
157	Farm30	pz	2006	1	71	s
158	Farm34	re	2006	1	52	s
145	Farm39	si	2006	1	52	nd
247	Farm7	cn	2011	1	52	r
248	Farm8	cn	2011	1	52	r
310	Farm8	cn	2010	1	52	s
318	Farm8	cn	2010	1	52	s
295	Farm1	//	2009	2	76	r
297	Farm1	//	2009	2	76	r
110i	Farm10	cr	2008	2	76	s
245	Farm14	cr	2011	2	76	r
271	Farm15	cr	2009	2	76	s
338	Farm15	cr	2010	2	76	r
150	Farm20	mn	2006	2	77	r
153	Farm20	mn	2006	2	74	r
156	Farm21	mn	2008	2	76	r
156m	Farm26	mo	2006	2	76	s
254	Farm26	mo	2011	2	76	r
257	Farm26	mo	2011	2	76	r
259	Farm26	mo	2011	2	76	r
302	Farm27	no	2010	2	76	r
136	Farm3	bs	2008	2	76	s
151	Farm33	re	2006	2	74	r
152	Farm33	re	2006	2	74	r
244	Farm37	re	2011	2	76	r
nc1	Farm38	re	2011	2	76	r
159	Farm41	mn	2006	2	74	r
166	Farm43	re	2006	2	74	r
96i	Farm9	cr	2008	2	76	s
108i	Farm19	mn	2008	3	72	s
128	Farm11	cr	2008	3	72	s
137	Farm12	cr	2005	3	73	nd
143	Farm31	re	2006	3	72	s
148	Farm4	bs	2006	3	72	s
169	Farm35	re	2003	3	72	nd
170	Farm23	mn	2003	3	72	r
172	Farm36	re	2003	3	72	s
232	Farm2	bg	2009	3	72	nd
246	Farm16	fe	2011	3	72	r
135	Farm40	vr	2005	4	69	nd
154	Farm25	mo	2006	4	69	r
160	Farm18	lo	2006	4	69	r
161	Farm42	mo	2006	4	69	r
167	Farm22	mn	2003	4	69	s
240	Farm13	cr	2009	4	78	s
146	Farm32	re	2006	s1	68	s
190	Farm24	mn	2009	s1	68	s
203	Farm5	bs	2009	s1	68	s
243	Farm6	bs	2011	s2	75	r

Lo stesso gruppo clonale è stato evidenziato con la stessa tonalità di grigio.
[a]Suscettibilità alle pleuromutiline: la sigla r indica i ceppi a ridotta sensibilità (MIC >1 mg/ml) per almeno una tra tiamulina e valnemulina, la sigla s i ceppi con MIC<1mg/ml ad entrambi i farmaci, la sigla nd sta per "non determinato".

All strain in the same clonal complex are highlighted with the same background shade in grey scale.
[a] Pleuromutilins susceptibility: r stands for strains with reduced sentivitivity (MIC >1 mg/ml for at least one between tiamulin and valnemulin), s stands for susceptible strains (MIC<1mg/ml for both drugs), nd stands for "not determined"

Figura 1: dendrogramma basato sul profilo allelico dei 52 ceppi italiani sequenziati. Il metodo utilizzando per la costruzione dell'albero è UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) la cui robustezza è stata testata tramite *bootstrap* con 1000 repliche attraverso il programma START2 (Jolley et al 2001). Cc1, 2,3,4 rappresentano i gruppi clonali individuati dall'analisi BURST (ogni ST deve combaciare con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci) che classifica come singolarità i 4 ceppi riportanti profilo allelico ST 68 e ST 78.
Figure 1: Dendrogram generated using UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) methods, from combined individual distance matrices of sequence from seven loci *adh, est, gdh, glpK, pgm e thi* in 52 Italian strains of *Brachyspira hyodysenteriae* divided in 12 Sequence type (ST). The clonal complex (Cc) individuated in the present study is reported on the top of the branch line of the STs.

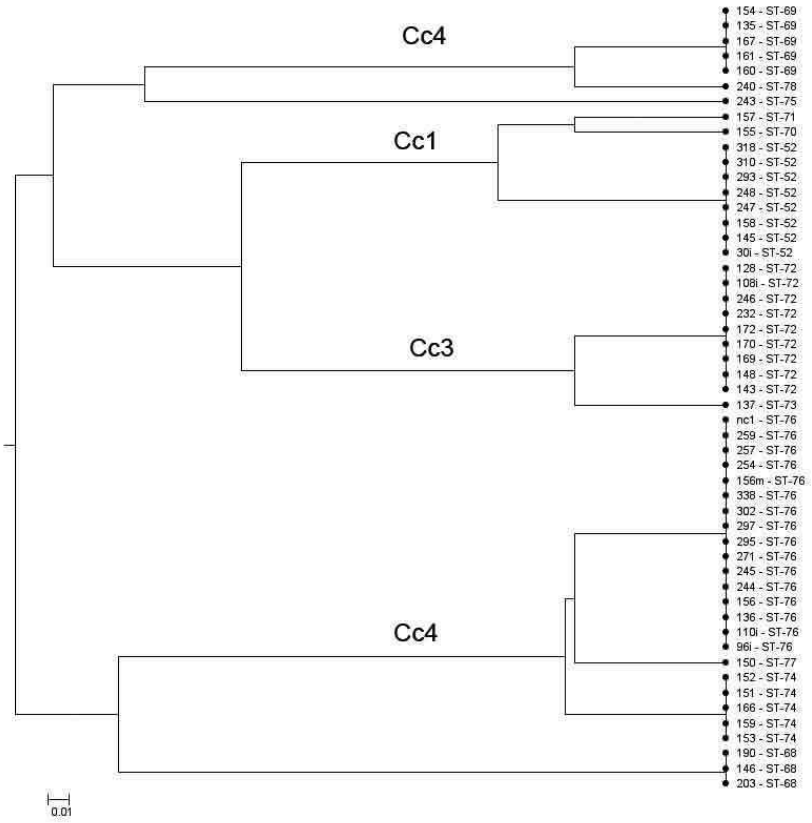
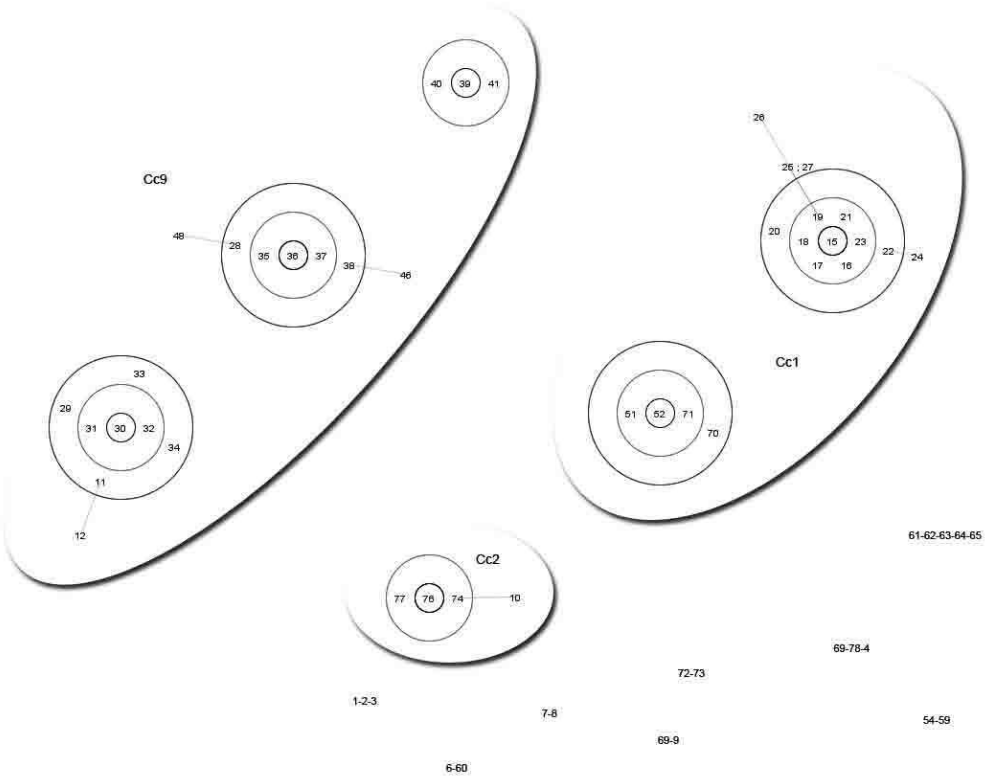


Figura 2: 11 Gruppi clonali rappresentanti 65 ST ottenuti da 163 ceppi di *B. hyodysenteriae* di cui 52 italiani (questo studio) e 111 ceppi presenti in banca dati PubMLST (http://pubmlst.org/), tramite analisi BURST (ogni ST deve combaciare con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci) usando la versione elettronica eBURST (Feil et al. 2004) disponibile all'interno del programma START2. A questi raggruppamenti, vanno aggiunti 13 ST (1 ST italiano) classificati come singolarità dall'analisi.

Figure 2: Population snapshot obtained with eBRUST (Feil et al. 2004) using nucleotide sequence at seven loci, with 163 *B. hyodysenteriae* strain divided in 65STs (11 STs belong to Italian strain, only). Clonal complexes are grouped if ST matches at least one other ST in group at 5 or more loci. 13 STs (1 ST belong to Italian strain) are classified as singletons by the analysis and not represented in this picture.



DISCUSSIONE

In questo lavoro, vengono per la prima volta genotipizzati isolati di *B. hyodysenteriae* di provenienza italiana tramite *multilocus sequence typing* (MLST). Il numero di ceppi sequenziati è rilevante e permette di arricchire la banca dati attualmente disponibile, costituita in tutto da 111 ceppi, cui si aggiungeranno i 52 ceppi italiani sequenziati in questo studio. Di fatto dopo i ceppi Australiani, che rappresentano la maggior parte dei ceppi caratterizzati fino ad ora (82 su 111), i ceppi italiani risultano essere i più genotipizzati.

Tra i ceppi italiani sono stati individuati 12 profili allelici (ST) di cui 11 nuovi e uno già

precedentemente rilevato e presente in banca dati PubMLST (http://pubmlst.org/). I 12 profili allelici (ST) sono raggruppati in 4 gruppi clonali oltre a due profili ST classificati come singolarità dall'analisi di BURST. Confrontando i ceppi italiani con tutti i ceppi presenti in banca dati, quelli che erano raggruppati all'interno del Cc1, vengono accomunati a ceppi isolati in Germania e Belgio fin dagli anni '90 e potrebbero costituire ceppi di antica introduzione ancora circolanti sul territorio italiano. Il Cc2, numericamente più rappresentato tra i ceppi italiani, trova come unico ceppo a loro accumulabile un ceppo isolato negli anni '70 nel Regno Unito. Questo ceppo potrebbe essere arrivato nel nostro Paese con l'importazioni di genetiche inglesi e da esso potrebbero essersi evoluti i ceppi attualmente raggruppabili nel Cc2 italiano. Il Cc3, individuato in questo studio, non trova nessuna connessione con il resto dei ceppi presenti in banca dati e potrebbe rappresentare un complesso clonale di ceppi soltanto italiani. Il Cc4, trova una singolare connessione con un ceppo isolato in Canada nel 1989.

Il primo dei profili identificati come singolarità (ST68) dall'analisi di BURST tra i ceppi italiani, viene accomunato a due ceppi svedesi isolati nel 2003, mentre il secondo profilo classificato come singolarità (ST75) resta tale anche se confrontato con tutti i ceppi mondiali presenti in banca dati. Questo ceppo proviene da una azienda del Nord Italia, localizzata in una provincia ad alta densità suinicola ed è resistente alle pleuromutiline. Seguire la diffusione di questo particolare ST, potrebbe rilevarsi utile al fine di individuarne la possibile origine e suggerirne eventuale opzioni di gestione e controllo.

Queste osservazioni devono tenere conto del fatto che la numerosità dei ceppi europei contenuti in banca dati è ancora molto ridotta. Questa stessa tecnica è stata di recente applicata anche in Spagna (Osorio et al. 2010) ma i ceppi Spagnoli non risultano purtroppo depositati in banca dati. Un numero maggiore di ceppi genotizzati tramite MLST sarà necessario per meglio chiarire le relazioni geografiche tra i ceppi di *B. hyodysenteriae* europei

I 52 ceppi italiani presentano un indice di associazione significativamente differente da zero, il che impone un significativo allontanamento di questi ceppi dall'equilibrio genetico (Equilibrio di Hardy-Weinberg). Popolazioni di questo genere sono popolazioni definite clonali (Smith et al. 1993). Questo risultato conferma quanto ottenuto da La et al. (2009) applicando la metodica MSLT e contrasta invece con quanto precedentemente ottenuto con l'elettroforesi delle proteine enzimatiche, MLEE, (Trott et al. 1997), sulla base della quale le popolazioni di *B. hyodysenteriae* erano state descritte come popolazioni ricombinanti con una struttura di popolazione epidemica. Quanto osservato da Trott et al. (1997), si osserva quando si hanno elevati scambi genetici tra i ceppi che comunque permettono l'affermarsi di gruppi clonali, sotto l'azione di una qualche pressione selettiva. Anche ripetendo l'analisi del calcolo dell'indice di associazione su tutti i ceppi tipizzati tramite MLST a livello mondiale (111 ceppi della banca dati cui si sommano i 52 ceppi italiani), il risultato da noi ottenutosi conferma con un I_A significativamente differente da 0 (dati non mostrati). Considerando anche i ceppi italiani di questo studio, il numero totale di ceppi tipizzati con MLST è attualmente 163, un numero minore di quanti analizzati tramite MLEE (231), anche se con una tecnica in possesso di un potere discriminante maggiore (La et al. 2009). Il differente numero di ceppi può spiegare la differente classificazione delle popolazioni ottenute a seconda del metodo di genotipizzazione utilizzato, per cui la tipizzazione di un maggior numero di ceppi sarà necessaria per meglio classificare le popolazioni batteriche di *B. hyodysenteriae.* Va però considerato, che la differente tecnica utilizzata potrebbe comunque comportare differenti risultati considerato che, mentre la MLEE confronta l'espressione fenotipica delle informazioni contenute nel cromosoma batterico, la MLST caratterizza i ceppi in base alle sequenze di DNA. E' noto infatti che il codice genetico del DNA risulta essere degenerato

per cui non tutte le mutazioni nella sequenza genetica si traducono in un cambiamento nella proteina tradotta (fenotipo). Per tale motivo la MLST risulta essere una tecnica che risente meno della MLEE della selezione naturale tendente ad operare in modo selettivo sui fenotipi ed in modo più neutro sui genotipi. L'utilizzo di un indicatore neutro alla selezione è condizione indispensabile per una corretta misurazione dell'equilibrio genetico di una popolazione (Li et al. 1988).
Studi effettuati su ceppi appartenenti alla medesima azienda ed isolati in anni differenti, testimoniano l'esistenza di una pressione selettiva che può portare all'affermarsi di un ceppo aziendale che nel tempo può essere soppiantato da un altro ceppo derivante dal primo per fenomeni "micro-evolutivi" (Atyeo et al 1999, La et al. 2009). Quindi l'apparente stabilità genetica individuata nella popolazione di ceppi di *B. hyodysenteriae* può essere spiegata con l'affermarsi di un numero non elevato di cloni che risultano selettivamente avvantaggiati e che si mantengono tali all'interno degli allevamenti Italiani. In cinque su 6 casi in cui erano disponibili sequenze ripetute sulla medesima azienda in lo stesso ST è stato rilevato negli anni, in un caso anche in un arco di 5 anni tra il primo e l'ultimo isolato tipizzato. Soltanto in una azienda, i ceppi isolati hanno mostrato ST differenti, che però risultano associati tra loro nel medesimo gruppo clonale, per cui potrebbero rappresentare un esempio di micro-evuluzione all'interno dello stesso allevamento (Atyeo et al 1999).
E' ragionevole ipotizzare che i trattamenti antibiotici possano fungere da pressione selettiva nei confronti dei ceppi presenti in allevamento, anche se il profilo di suscettibilità agli antibiotici non permette di differenziare i gruppi clonali individuati in questo studio. Infatti in ognuno dei gruppi clonali ottenuti, ricadono sia ceppi pienamente sensibili sia ceppi a ridotta sensibilità per le pleuromutiline, anche se nel Cc2 ricadono numericamente la maggior parte dei ceppi con MIC>1μg/ml (17 su 26) ad almeno un farmaco tra tiamulina e valnemulina. Un numero maggiore di ceppi tipizzati tramite MSLT e parallelamente testati per la sensibilità *in vitro* permetterà forse di individuare con maggior dettaglio il ruolo esercitato da questo importante fattore che, comunque, non può essere ritenuto l'unico agente selettivo nei confronti delle popolazioni batteriche. Altri fattori, quali ad esempio la genetica, la provenienze degli animali, la gestione dei flussi e della biosicurezza, devono essere considerati in un più ampio studio volto ad individuare eventuali fattori favorenti l'istaurarsi di un determinato gruppo clonale all'interno di una tipologia di allevamento.
La metodica MLST si conferma come un importante strumento per la tipizzazione molecolare dei ceppi di *B. hyodysenteriae* circolanti sul territorio nazionale. Una sua applicazione su vasta scala potrebbe consentire di individuare vie epidemiologiche di diffusione di determinati ST tra gli allevamenti, offrendo opzioni di gestione nei confronti di questa importante problematica ancora molto presente sul territorio nazionale.

BIBLIOGRAFIA

Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1999. Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol. Infect. 123, 133–138.
bacteria? Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 4384–4388.
Baum, D.H., Joens, L.A., 1979. Serotypes of beta-haemolytic *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 25, 792–796
Bonilauri P., Merialdi G., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. Incremento del riscontro di ceppi multiresistenti di *Brachyspira hyodysenteriae* in allevamenti suini del nord Italia. 2004. Atti del XXX convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Salsomaggiore Terme (PR) 25-26 Marzo 2004, 181-186.

Chan M-S, Maiden, MCJ, Spratt D.(2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. Bioinformatics 17:1077-1083.
Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186, 1518–1530
Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.S., Maiden, M.C., 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics 17, 1230–1231.
La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ. (2009). Multilocus sequence typing as a tool for studyng the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Veterinary Microbiology 138: 330-338
Li CC (1988) Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg law. Genetics 119:731-737.
Magistrali C.F., Cucco L., D'Avino N., D'Angelo G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Valutazione della sensibilita' ad antimicrobici di *B.hyodysenteriae*: confronto tra due metodi. Atti XXXVI Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, 25-26 Marzo 2010, Montichiari (BS), pp337-340
Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R. Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Faevers IM, Achtman M, Stratt BG (1998). Multilocus sequence typing: a portable apporoach to the identification og clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140-3145.
Merialdi G., P Bonilauri, M Dottori. Presence of tiamulin and valnemulin resistant *B. hyodysenteriae* strains in Italian pig herds. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006-Volume 2: p 455
Osorio J., Carvajal A., Hidalgo A., Argüello H., Naharro G., Rubio R., Hampson DJ. 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada 2010-Volume 2: p 418
Råsbäck, T., Johansson, K.-E., Jansson, D.S., Fellstro¨m, C., Alikhani, Y., La, T.,Dunn, D.S., Hampson, D.J., 2007. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes of the genus *Brachyspira*. Microbiology 153, 4074–4087.
Smith, N.H., O'Rourke, M., Spratt, B.G., 1993. How clonal are bacteria? PNAS May 15, 1993 vol. 90 no. 10 4384-4388.
Taylor D.J., Alexander T.J.L. (1971) "The production of dysentery in swine by feeding coltures containing a spirochaete". Br. Vet. J., 127, 58-61.
Wannemueler M.J. (1993) "Entèrite hèmorragique du porc: depistage et ètude clinique". Rec. Med. Vet., 169 (8/9), 703-707

IL BENESSERE ANIMALE NEGLI ALLEVAMENTI DI SUINI IN VENETO:OPINIONE ED ASPETTATIVE DEGLI ALLEVATORI

ANIMAL WELFARE IN PIGS' BREEDING IN VENETO REGION: FARMERS OPINIONS AND EXPECTATIONS

LONARDI C., SCOLLO A., CONTIERO B., GOTTARDO F.

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute – Università degli Studi di Padova
Corresponding author: chiara.lonardi.1@studenti.unipd.it

Parole chiave: Benessere animale, suini, opinione allevatori
Key words: Animal Welfare, pigs, farmer's opinion

Riassunto
Scopo dello studio è stato quello di conoscere l'opinione degli allevatori di suini del Veneto riguardo il benessere animale (d'ora in avanti indicato come BA) e alle possibili evoluzioni della sua legislazione. All'indagine hanno partecipato 30 allevatori iscritti all'Associazione Regionale Allevatori caratterizzati da 3 indirizzi produttivi: 8 aziende da riproduzione, 10 da ingrasso e 12 a ciclo chiuso. Il questionario utilizzato comprendeva 23 domande la maggior parte delle quali dedicate a conoscere il parere degli allevatori sul BA. Le risposte sono state analizzate attraverso il test χ^2 con procedura di Marascuilo per testare l'associazione tra tipo di produzione e risposte. I risultati hanno mostrato che il responsabile dell'azienda è la persona maggiormente dedita al BA (83,3% dei casi). Sia i proprietari che i dipendenti frequentano corsi di aggiornamento, ma la fonte d'informazione principale (34%) sembra essere l' associazione allevatori. Il BA è un concetto che gli allevatori associano per lo più all'idea di animali sani (29,4%) e con maggiore libertà di movimento (20%). Sono inoltre consapevoli dell'importanza che esso riveste nel migliorare l'immagine dell'azienda (18,3%), pur essendo fonte di costi e lavoro aggiuntivi; solo una minoranza (16%) ha espresso perplessità circa la sua importanza. In generale, tranne che per l'allevamento in gruppo delle scrofe gravide, gli allevatori concordano con l'attuale legislazione. Futuri interventi potenzialmente utili per migliorare il BA sono stati identificati prevalentemente a carico delle strutture, anche se sono la parte più difficile da cambiare, in ogni caso ritengono che l'attuale legislazione sia già troppo ricca di regole per cui non si aspettano nel breve periodo nuovi interventi.

Abstract
The aim of the study was to understand the opinion of pig farmers' of Veneto region (Italy) about animal welfare (AW) and its legislation. A questionnaire was submitted to 30 farmers selected to represent the 3 different type of productions: 8 farms addressed to reproduction, 10 to fattening and 12 had both types of production. The questionnaire included 23 questions; the first part regarded general information of the farm and the other questions concerned the farmers' opinion on AW. Data were analyzed using $\chi 2$ test with Marascuilo procedure to verify the association between type of production and responses.
Results showed that owner or manager is the person who is more involved in animal welfare (83.3% of respondents). Both owner and employees attend refresher courses, but the predominant source of information (34% of total farmers) seems to be the breeders' associations. AW is a concept that farmers mostly associate with the idea of healthy animals (29.4% of respondents) and greater movement freedom (20%). However, they are aware of the importance in improving

the image of the company (18.3%), despite having a source of higher costs and increased work; only a minority expressed strong concern about the importance of AW. Farmers in general agreed with the legislation except for breeding in groups of pregnant sows. Future interventions potentially useful for improving the well-being have been identified mainly dependent on structures even if they are the part more difficult to change, however respondents think that the current legislation is already too full of rules so they do not expect any new upcoming legislation.

INTRODUZIONE

Il settore suinicolo in Europa è andato incontro negli ultimi anni ad un incremento della produzione con il raggiungimento di 22 milioni di tonnellate di carne prodotte nel 2010, il 3,4% in più rispetto all'anno precedente (Eurostat, 2010). Tale sviluppo, unito alla crescente sensibilità da parte dei legislatori e dell'opinione pubblica (European Commission, 2007) nei confronti delle problematiche sul BA, ha determinato la necessità di stabilire dei requisiti minimi atti a garantire il benessere suino nell'allevamento intensivo.

L'Italia recepisce le Direttive Comunitarie 91/630/CEE e 2001/88/CE tramite i rispettivi Decreti Legislativi n.534 del 30 dicembre 1992 ed il n.53 del 20 febbraio 2004, ma il quadro continua ad aggiornarsi con la Direttiva Comunitaria 2008/120/CE redatta sulla base del Report EFSA del 1997 "The welfare of intensively kept pigs", e recepita con il D.Lgs n.122 del 7 Luglio 2011. Tali norme hanno lo scopo di fornire parametri oggettivi e precisi sia per quanto riguarda le condizioni generali delle aziende, sia per le singole categorie di suini. Le restrizioni introdotte spaziano dalle superfici libere totali a disposizione degli animali al tipo di pavimentazione, regolamentando anche l'ampiezza massima delle aperture del grigliato. Si introducono norme sull'allevamento in gruppo di scrofe e scrofette e sulla densità massima all'interno dei box. Argomenti di particolare interesse sono anche le mutilazioni, quali il taglio della coda, la riduzione degli incisivi e la castrazione, e l'accesso permanente a materiali che consentano ai suini l'attività di esplorazione e manipolazione.

Malgrado l'attualità dell'argomento BA e gli sforzi sul territorio italiano per uniformarsi agli elevati standard del Nord Europa, la realtà zootecnica nazionale pone problematiche elevate per la tipologia del suo allevamento e per l'unicità delle sue produzioni.

Nel seguente lavoro, facente parte del progetto Metadistretto della Zootecnia del Veneto, finalizzato all'innovazione ed al recupero di competitività in ambito di sanità, BA e tutela ambientale, sono state prese in esame l'opinione e le aspettative degli allevatori suinicoli in merito alla tematica del BA con riferimenti all'attuale legislazione.

MATERIALI E METODI

L'intervista, condotta dai tecnici dell'Associazione Regionale Allevatori, ha coinvolto 30 allevatori di suini della Regione Veneto prevalentemente localizzati nella Provincia di Treviso (46%). Le aziende sono state scelte in modo da rappresentare le diverse tipologie di allevamento ed erano quindi così distribuite: 12 a ciclo chiuso, 10 solo ingrasso e 8 solo riproduzione. Il questionario cui sono stati sottoposti gli allevatori era costituito da 23 domande principalmente a scelta multipla o con possibilità di aggiungere commenti o punteggi. In particolare, dopo una prima parte dedicata alle informazioni generali sull'allevamento (dimensioni e tipo di produzione, numero di addetti alla cura degli animali), mentre la restante parte delle domande riguardava l'opinione dell'allevatore riguardo la percezione, le normative, l'utilità e le prospettive in tema di BA nell'allevamento suino.

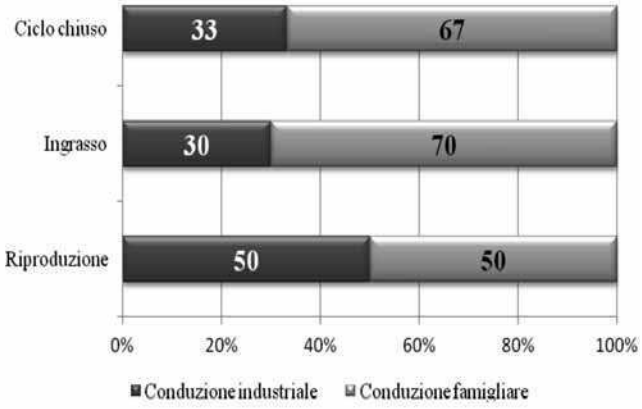
I dati sono stati analizzati attraverso il test χ^2 con procedura di Marascuilo per verificare l'eventuale associazione tra le risposte e l'indirizzo produttivo.

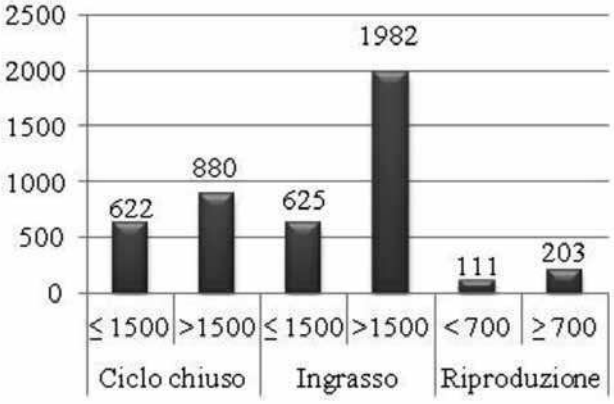
RISULTATI

Nel campione degli intervistati l'età media era di 42 anni mentre per quanto riguarda il titolo di studio, il 50% ha dichiarato di essere in possesso di diploma e/o laurea mentre l'altra metà del campione di un diploma di scuola media inferiore.

Dai risultati dei questionari è emerso che le aziende di dimensioni maggiori sono quelle che si occupano esclusivamente di ingrasso, con una media di 3400 capi presenti contro i 904 delle aziende da riproduzione; gli allevamenti a ciclo chiuso si collocano in posizione intermedia. Sempre le aziende da ingrasso presentano anche un rapporto tra numero di capi e addetti più elevato dal momento che le operazione da eseguire sono meno specialistiche e meno frequenti. Inoltre, questa tipologia di allevamento sembra essere maggiormente compatibile con una gestione famigliare (70% dei casi) malgrado l'elevato numero di animali presenti (Fig.1).

Fig.1 - Tipo di conduzione nelle aziende facenti parte del campione (a sinistra) e numero di animali allevati per addetto negli allevamenti di diverse dimensioni (a destra).





La formazione del personale

A prescindere dall'indirizzo produttivo dell'azienda, la persona che maggiormente si occupa di BA è il proprietario o responsabile (83,3% degli intervistati) mentre solo nel 13,3% dei casi sono i dipendenti a curare questo aspetto. La percentuale di proprietari che si occupa di benessere sale al 95% se si considerano gli allevamenti a conduzione prevalentemente famigliare, mentre è pari al 64% nelle aziende con numerosi dipendenti ed impostazione di tipo industriale. La maggior parte dei titolari e dei dipendenti (87%) afferma comunque di partecipare regolarmente a corsi di formazione e aggiornamento, nei quali i temi di comportamento, salute, legislazione ed indicatori di BA sembrano essere equamente affrontati. A prescindere dall'indirizzo produttivo, la principale fonte d'informazione degli allevatori in tema di benessere sembrano essere le associazioni di allevatori (indicate dal 34% degli allevatori totali) piuttosto che specifici corsi. Per le altre fonti di informazione sullo stesso tema esiste invece una variabilità legata al tipo di produzione. Ad esempio è interessante notare come il veterinario aziendale rappresenti la prima fonte d'informazione per le aziende da ingrasso, mentre si colloca solo al terzo posto per gli altri indirizzi produttivi ($P<0.05$) (Tab.1).

Tab.1 – Principali fonti di informazioni in merito al BA per gli allevatori dei diversi indirizzi produttivi in percentuale. Percentuali con lettere diverse differiscono significativamente ($P<0.05$).

Domanda	Indirizzo produttivo			P
	CC	I	R	
Fonti informazione				
riviste	22.22[a]	3.33[b]	25.00[a]	<0.01
associazioni allev	31.94	31.67	39.58	n.s.
vet aziendale	19.44[b]	38.33[a]	18.57[b]	<0.05
servizi vet asl	11.11	11.67	6.25	n.s.
corsi	4.17	13.33	6.25	n.s.
convegni	11.11[a]	0[b]	4.17[b]	<0.05
altro	0	1.67	0	n.s.

CC = ciclo chiuso; I = ingrasso; R = riproduzione

La percezione del benessere animale in allevamento

Il BA è sempre stato considerato dagli allevatori un concetto ampio (Menghi & Gastaldo, 2008), ma diversamente da quanto dimostrato in uno studio condotto da Te Velde et al. (2002) in cui solo i consumatori aggiungevano il valore della libertà di movimento, in questo caso anche per gli allevatori il BA è risultato ugualmente associato sia alla salute degli animali (29,4% delle risposte)quanto proprio alla maggior possibilità di movimento (20%). Essi sono inoltre consapevoli dell'importanza che tale aspetto assume nel migliorare l'immagine dell'azienda (18,3%) visto il crescente interesse da parte di consumatori ed opinione pubblica, malgrado rappresenti fonte di maggiori costi soprattutto per le aziende a ciclo chiuso ($P<0.05$) e aumento del lavoro in particolar modo per le scrofaie ($P<0.05$) (Tab.2). E' comprensibile che il BA sia interpretato come una perdita economica principalmente negli allevamenti legati alla riproduzione in quanto tale settore è quello maggiormente in crisi e che più difficilmente riesce a far fronte alle modifiche richieste per management a strutture. A prescindere dall'indirizzo produttivo, la maggior parte degli allevatori si aspetta

comunque una maggiore soddisfazione nel lavoro a seguito del miglioramento dello stato di benessere degli animali nel proprio allevamento, mentre solo una minoranza (16%) esprime forti perplessità a proposito e non si aspetta alcun beneficio diretto da questi cambiamenti.

Tab.2 Significato del BA per gli allevatori dei diversi indirizzi produttivi in percentuale. Percentuali con lettere diverse differiscono significativamente (P<0.05).

Domanda	Indirizzo produttivo			P
	CC	I	R	
Significato benessere				
più sani	22.22	36.67	31.25	n.s.
maggiori costi	23.61[a]	8.33[b]	12.50[b]	<0.05
più liberi	16.67	30.00	12.50	n.s.
migliore immagine	19.44	13.33	22.92	n.s.
maggiori guadagni	5.56	5.00	4.17	n.s.
più lavoro	12.50[a]	1.67[b]	16.67[a]	<0.05
più sussidi	0.00	1.67	0.00	n.s.
altro	0.00	3.33	0.00	n.s.

CC = ciclo chiuso; I = ingrasso; R = riproduzione

Opinione sulle norme legislative specifiche

Per quanto riguarda l'applicazione delle norme specifiche sul BA imposte dalla legislazione, non sempre il giudizio delle aziende è positivo sulla loro reale utilità. Gli intervistati di tutti gli indirizzi produttivi hanno infatti indicato all'unanimità di essere concordi con le indicazioni legislative che regolamentano l'età dello svezzamento dei suinetti, non inferiore a 28 giorni, e con le norme per lo spazio minimo per capo a disposizione sia delle scrofe che degli animali all'ingrasso. Tuttavia, l'allevamento in gruppo delle scrofe gravide è interpretato come un obbligo di scarsa utilità, forse per il timore che il provvedimento possa portare ad un drammatica perdita economica a causa dell'eventuale aumento degli aborti e riassorbimenti, oltre che a un ulteriore investimento in strutture e tempo per la movimentazione degli animali (Fig.2).

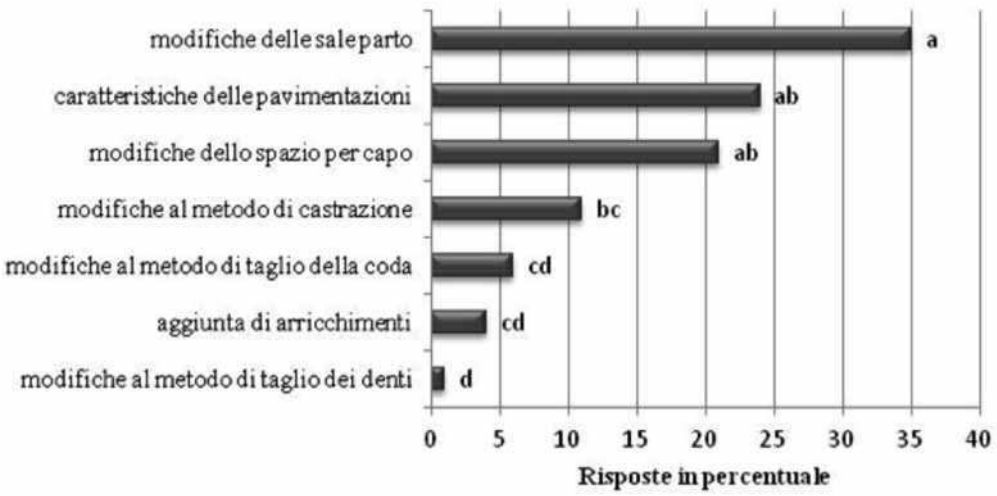
Fig.2 - Grado di importanza ed utilità derivante dall'applicazione delle norme specifiche per il BA.

Gli interventi futuri considerati potenzialmente utili ai fini del miglioramento del benessere sono stati individuati soprattutto a carico delle strutture nonostante rappresentino la parte più difficile da modificare con conseguenti incrementi di spesa. Altri aspetti considerati importanti ma secondari rispetto alle modifiche delle strutture sono le pratiche che possono provocare dolore agli animali, come la castrazione, il taglio della coda e dei denti ed una maggiore formazione del personale addetto agli animali.
L'individuazione di arricchimenti ambientali da fornire ai suini per la loro attività esplorativa è considerata dagli allevatori, in particolare da chi si occupa di riproduzione, tra gli interventi di minore utilità per il miglioramento del benessere in allevamento. Questo è particolarmente evidente nelle aziende che si occupano di riproduzione, probabilmente perché la distribuzione di materiale manipolabile ad animali stabulati in gabbia è ancora un problema irrisolto dal punto di vista gestionale. Una buona parte delle aziende (90%) fornisce, infatti, catene metalliche agganciate alle pareti e solo il 7% degli allevamenti riconosce l'utilità degli arricchimenti manipolabili e grufolabili come suggerito dalla normativa vigente.

Aspettative di una nuova legislazione

Eccezion fatta per gli arricchimenti, gli intervistati affermano che l'attuale normativa è già fin troppo ricca di regole e restrizioni e pertanto non si aspettano alcuna novità legislativa imminente. Tuttavia il quadro normativo europeo sembra essere in contrasto con tali aspettative e foriero di cambiamenti. Gli intervistati affermano che gli interventi che li metterebbero maggiormente in difficoltà sono la richiesta di modifiche alle sale parto (35%), modifiche delle caratteristiche delle pavimentazioni (24%) e dello spazio/capo (21%). Interventi che riguardano gli arricchimenti ambientali ed i metodi di castrazione e taglio della coda sarebbero invece relativamente meno difficili da gestire, considerando che si limiterebbero a richiedere un cambiamento di alcune pratiche manageriali piuttosto che costose modifiche a strutture ed impianti (Fig.3).

Fig.3 - Interventi legislativi la cui attuazione potrebbe mettere in difficoltà gli allevatori a prescindere dall'indirizzo produttivo. Percentuali con lettere diverse differiscono significativamente ($P<0.05$).



Secondo il parere degli allevatori intervistati, per rispondere in modo efficace ai futuri provvedimenti legislativi bisognerebbe muoversi primariamente con la richiesta di contributi per la riorganizzazione delle aziende. In secondo luogo,sarebbe necessario fare pressione sui politici locali e nazionali per evitare l'emanazione di nuove norme, ed infine interagire maggiormente con il mondo della ricerca per individuare delle soluzioni praticabili a livello nazionale da proporre ai tavoli di discussione europei, magari coinvolgendo anche le associazioni di categoria.

Sistemi di valutazione del benessere in allevamento

Con la formula del questionario si è affrontato anche il discorso relativo all'interesse nei confronti di eventuali sistemi di valutazione rapida del benessere dei suini in allevamento. Sebbene tale strumento sia riconosciuto dagli allevatori essere utile al miglioramento del BA, delle prestazioni produttive, della gestione e dell'immagine dell'azienda, la più frequente obiezione verso il suo utilizzo è stata la mancanza di un profitto legato alla sua applicazione dato che non è attualmente valorizzato dal sistema commerciale. Parallelamente esiste il timore di un possibile aumento dei costi di produzione legato alle visite e controlli di uno specifico ente preposto. D'altra parte non avrebbe alcun senso proporre strategie produttive particolarmente rispettose dei bisogni degli animali che si rivelassero svantaggiose dal punto di vista economico o addirittura impattanti in termini di sostenibilità ambientale dell'allevamento (Cozzi, 2008).

Va tuttavia sottolineato il fatto positivo che un tale sistema non sia interpretato dall'allevatore come una perdita di tempo, ma piuttosto come uno strumento per informare il consumatore sulle buone pratiche di allevamento adottate, valorizzando la filiera di produzione. Può capitare che un allevamento metta sul mercato alimenti di origine animale con un prezzo più elevato, perché prodotti secondo le buone pratiche zootecniche rispettose del BA ma che non sempre sono recepiti dal consumatore come tali, anche se i consumatori sembrano essere disposti a spendere di più in cambio di animali allevati nel maggior rispetto del benessere possibile(European Commission, 2007).All'unanimità, gli intervistati di tutti gli indirizzi produttivi hanno espresso la preferenza di un rapporto diretto con il valutatore, scegliendo di poter eventualmente ricevere una copia cartacea dei risultati della valutazione direttamente da chi l'ha effettuata. Largo favore è stato manifestato nei confronti dei tecnici dell'Associazione Allevatori, quali figure ideali per la raccolta dei dati di valutazione in allevamento (Fig.4).

Fig.4 – Preferenza % degli allevatori per la figura più idonea ad effettuare valutazioni sul BA in allevamento (a sinistra) e preferenza % del formato del risultato da ricevere (a destra).

I risultati di questa parte del questionario indicano che gli allevatori avrebbero piacere di relazionarsi con degli operatori per avere uno scambio diretto di informazioni. Tuttavia, sebbene questi risultati indichino un'apertura nei confronti di un sistema di monitoraggio, il 70% afferma di non essere disposto a pagare per averlo nemmeno nel caso in cui i vantaggi ottenuti superassero i costi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'indagine svolta ha avuto lo scopo di studiare le opinioni degli allevatori di suini in tema di BA. Ne è emersa la consapevolezza che sono importanti l'aggiornamento e la formazione professionale, ma che le fonti di informazione sarebbero forse più efficaci se differenziate per indirizzo produttivo.

Il BA è prevalentemente associato al miglioramento dell'immagine dell'azienda, tuttavia esso è visto anche come una fonte di maggiori costi e lavoro soprattutto per le aziende da riproduzione. E' positivo comunque che solo una minoranza degli intervistati esprima forti perplessità all'ottenimento di benefici legati all'introduzione di principi di benessere.

La presenza di arricchimenti ambientali è ancora limitata in termini di numero e di tipologia. E' interessante quindi notare che gli allevatori danno ancora scarsa importanza a questo aspetto, forse perché non ne percepiscono gli effetti sul benessere e sulla tranquillità degli animali, e quindi sulla loro produttività.

Nuovi interventi legislativi sul tema del benessere sono considerati poco probabili, e gli allevatori si troverebbero in grande difficoltà soprattutto se l'introduzione di nuove norme riguardasse modifiche alla sala parto e alle pavimentazioni.

E' interessante notare come l'evenienza di nuove norme che regolino ulteriormente le mutilazioni spaventino meno rispetto cambiamenti di tipo strutturale, indice di una preoccupazione più di tipo economico che manageriale.

Emerge, infine, la necessità di una valutazione e certificazione del benessere rispettato in allevamento: se l'allevatore dichiarava di confidare principalmente nelle proprie capacità di osservazione (Menghi & Gastaldo, 2008), mentre vedeva nel veterinario ufficiale un ruolo di puro controllo della conformità delle aziende alle norme vigenti (Gastaldo & Menghi, 2007), da questa indagine emerge che l'introduzione di sistemi di valutazione rapida del benessere dei suini in allevamento è riconosciuto dagli allevatori essere utile al miglioramento del BA, delle prestazioni produttive, della gestione e dell'immagine dell'azienda, anche se resta comunque il timore degli aumenti dei costi perché non valorizzato dal sistema commerciale. La figura con la quale gli allevatori avrebbero maggior piacere di scambio di informazioni, e che ritengono possa essere idonea al compito di tale valutazione, è il tecnico dell'Associazione Allevatori, preferito rispetto ad altre figure professionali come il veterinario probabilmente perché percepito più dalla parte della categoria.

I risultati di questa indagine possono suggerire nuovi metodi di approccio ed argomenti di discussione con le principali fonti di aggiornamento sul tema del benessere per gli allevatori. Maggiore informazione dovrebbe essere data inoltre anche sulle attività svolte a livello Europeo e Nazionale da specifici comitati scientifici chiamati ad individuare le criticità per il benessere dei suini a livello aziendale (quali i report EFSA e DG SANCO), attività che rappresentano infatti la base delle normative future. Interessante sarebbe anche studiare un sistema di valutazione rapida del benessere in allevamento che possa valorizzare le aziende che seguono le principali norme di benessere, senza però rappresentare per loro un costo aggiuntivo.

BIBLIOGRAFIA

Cozzi G.(2008) “Benessere animale: vantaggio competitivo o vincolo alla produzione?” Quaderno SOZOOALP 5.

Decreto legislativo 7 luglio 2011, n.122. Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.

European Commission (2007). EU Consumers Willing to Pay for Better Animal Welfare. Available on http:// europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/07/398 and type=HTML and aged=0 and language=EN and guiLanguage=en

Gastaldo A., Menghi A. (2007)“Il benessere in stalla visto dagli allevatori”. Informatore Zootecnico, 19.

Menghi A., Gastaldo A. (2008) “Il ruolo e le prospettive del benessere animale: vincoli o opportunità per gli allevatori?” Agriregionieuropa 13.

Te Velde, H.T., Aarts, N., Van Woerkum, C., (2002) “Dealing with ambivalence: farmers’ and consumers’ perceptions of animal welfare in livestock breeding” J. Agric. Environ. Ethics 15 (2), 203–219.

EFFICACIA DEL BROMURO DI POTASSIO SOMMINISTRATO PER VIA ORALE NEL CONTROLLO DELLE INTERAZIONI SOCIALI DEI SUINI

EFFICACY OF POTASSIUM BROMIDE ADMINISTERED ORALLY IN THE CONTROL OF THE SOCIAL INTERACTIONS OF SWINE

BARICCO G.[1], PIOVANO R.[2]

1. Medico Veterinario Libero Professionista, Torino. giuseppe@baricco.it
2. Medico Veterinario Libero Professionista, Chieri (TO). bianconero2@libero.it

Parole Chiave: comportamento, sedativi, benessere animale
Keywords: behavior, sedatives, animal welfare

***Riassunto*:** E' stato condotto un esperimento per valutare l'effetto della somministrazione di KBr per via orale (100 mg/kg p.v per 7 giorni seguiti da altri 7 giorni alla dose di 50 mg/kg di p.v.) sulla intensità delle interazioni sociali tra gruppi di suini del peso di kg. 70 circa sottoposti a rimescolamento. La valutazione delle interazioni sociali è avvenuta esaminando fotografie eseguite ogni 10 minuti da un impianto automatizzato ed attribuendo uno specifico punteggio ai diversi comportamenti degli animali. Il trattamento ha avuto un chiaro effetto calmante nei primi tre giorni dopo il mescolamento (P<0,01), ed ha generato un comportamento più calmo dei suini sull'intero periodo di osservazione (P<0,01). Si conclude che il trattamento con KBr in acqua da bere può essere una soluzione per problemi comportamentali dei suini altrimenti difficili da risolvere.

***Abstract*:** Has been conducted an experiment to evaluate the effect of KBr by oral route (100 mg/kg b.w. for 7 days followed from other 7 days at 50 mg/kg b.w.) on the intensity of the social interactions between groups of pigs submitted to mixing. The evaluation of the social interactions has been done by examination of photographs done from an automatic device every 10 min and attributing a specific score to every behavior of the pigs. The treatment exerted a clear calming effect in the first three days after mixing (P<0,01), and has produced a quieter behavior of the animals along the entire period of observation (P<0,01). It is conclude that KBr treatment in the drinking water can be a solution for behavioral problems of the pigs hard to be solved otherwise.

INTRODUZIONE

Le vigenti norme sul benessere animale, ed in particolare quelle che fanno riferimento al benessere suino (DL 07/07/2011 – Dir 2008/120/CE) mentre confermano per legge la necessità di più frequenti interazioni sociali tra i suini allevati, non mancano tuttavia di rilevare come questa pratica, a causa del naturale comportamento dei suini (che tendono immediatamente a stabilire gerarchie all'interno dei gruppi), possa ingenerare problemi comportamentali:
"..omissis…. Qualora si manifestino segni di lotta violenta, occorre immediatamente indagare le cause e adottare idonee misure, quali fornire agli animali abbondante paglia, se possibile, oppure altro materiale per esplorazione. Gli animali a rischio o particolarmente aggressivi vanno separati dal gruppo…. omissis …. La somministrazione di tranquillanti per facilitare la commistione va limitata a condizioni eccezionali e dietro prescrizione di un veterinario…. omissis…."

Dunque le norme sul benessere riconoscono che talvolta si possono generare problemi di aggressività di gruppo tra i suini, e che questi eventi possono essere esacerbati o stimolati dagli episodi di mescolamento e di creazione di gruppi, ammettendo che in condizioni particolari e sotto controllo veterinario sia possibile ricorrere a farmaci tranquillanti.
La somministrazione di un blando sedativo, sufficientemente efficace e sicuro per i suini quanto per il consumatore di carni provenienti da animali trattati, risponderebbe a queste nuove esigenze, oltre che ai vecchi e ben noti problemi legati al cannibalismo suino propriamente detto, al tail , flank ed ear biting conosciuti a tutti i praticanti la clinica suina per la loro insidiosità e pericolosità quando si manifestano in forme generalizzate in tutto l' allevamento, con modalità e tempi il più delle volte imperscrutabili e difficilmente comprensibili.
Il bromuro di potassio, farmaco scoperto nel 1857 dal medico inglese Charles Locock, che ne mise in evidenza le proprietà calmanti ed anticonvulsive, ha avuto in medicina umana amplissimo e consolidato uso fino al 1927, anno in cui furono scoperti i barbiturici che ne soppiantarono quasi universalmente l'uso. Esso veniva utilizzato per prevenire le crisi epilettiche e per curare i disturbi del comportamento: successivamente all'introduzione dei barbiturici, oltre all'anedottico uso nelle caserme, nei collegi e nelle carceri, il suo uso farmaceutico è rimasto confinato alla terapia di seconda scelta, in alternativa od in associazione ai barbiturici, per la prevenzione delle crisi epilettiche.
In questa prospettiva ancora oggi è utilizzato in medicina canina particolarmente in Nord America, con prescrizioni off-label da parte dei Medici Veterinari.
In Germania invece è ancora in vendita un farmaco a base di bromuro di potassio (*Dibro-be mono*) destinato alla prevenzione degli attacchi epilettici nell'uomo.
Il rapporto EMEA/MRL/538/98 , che inserisce il KBr tra le sostanze per le quali non è richiesto un tempo di sospensione, a proposito dell'attività farmacologica ne indica gli effetti (ipnotico, sedativo), le specie di destinazione (bovino, ovino, equino, suino), le posologie (da 40 a 120 mg/kg/pv), tuttavia, non citandolo, ammette che il meccanismo di azione è sostanzialmente sconosciuto. E tale in effetti è sempre stato considerato dalla maggioranza degli Autori che si sono occupati della molecola, orientati più a verificarne l'efficienza in termini di risultati concreti che ad indagare sui possibili modi di azione. Le caratteristiche di non tossicità e di sicurezza per il consumatore umano e per l'ambiente, abbondantemente citate nel rapporto EMEA/MRL/538/98, ne rendono interessante la valutazione d'uso, come farmaco da usarsi in condizioni di emergenza, nella specie suina, alla luce dei problemi comportamentali indotti da un lato dalla pregressa intensivizzazione delle produzioni, e dall'altro dalle maggiori occasioni di socializzazione generate dalle recenti norme sul benessere animale, Non essendo stati, fino ad ora, pubblicati lavori sugli effetti del KBr sul comportamento suino, occorre fare riferimento alla non estesa bibliografia disponibile per altre specie, in particolare l'uomo ed il cane.
Inoltre molti lavori sono alquanto vecchi, soprattutto quelli che fanno riferimento ai tentativi di spiegazione del meccanismo di azione ed alla farmacodinamica dei bromuri, mentre materiale più recente è reperibile sui rapporti clinici e sugli usi terapeutici.
La modalità di azione del bromo viene spiegata sul sito web del College of Veterinary Medicine di Auburn (US) attraverso "*la competizione, ovvero la sostituzione del cloro con il bromo nella cellula (e nel neurone) , in tal modo incrementando l'elettronegatività della cellula ed iperpolarizzandola",* riprendendo il concetto espresso da Adams nel 1999 (*Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 7° Edition,* Iowa State University Press), dove si aggiunge che in tale modo il potenziale di riposo della membrana (Resting Membrane Potential) diventa ancor più negativo in relazione al suo potenziale di azione, in tale modo rendendo la cellula meno reattiva.

I potenziali d'azione sono rapide variazioni nel potenziale di membrana del neurone, che passa dal normale valore negativo verso un valore positivo (attraverso l'ingresso nel citoplasma neuronale di ioni Na+ e K+), e termina con una azione di riequilibrio che ripristina il normale potenziale negativo. Questo meccanismo di attivazione-neutralizzazione è la base della funzionalità del sistema nervoso. Il potenziale di riposo di una cellula nervosa è circa -70mV: se la membrana si depolarizza fino a -55mV ("valore soglia") si ha l'apertura dei c.d. canali del sodio/potassio, che fanno sì che ioni positivi entrino nella cellula, depolarizzando ulteriormente la membrana fino a valori di +35 mV. Successivamente alla attivazione del neurone si innesca il "ciclo di Hodkin" il quale sfruttando l'energia delle pompe ATPasi Na+ e K+ ripristina il normale stato di elettronegatività della cellula (potenziale di riposo, -70mV). Il potenziale d'azione dura, nella trasmissione neuronale, circa 2 millisecondi.
Dunque il potenziale d'azione è caratterizzato dal susseguirsi di una fase di depolarizzazione, una fase di iperpolarizzazione postuma che persiste per alcuni millisecondi e, infine, da una rapida fase di ripolarizzazione che riporta i valori alla condizione iniziale di riposo.
La parziale sostituzione dello ione Cl- con lo ione Br- nella cellula nervosa determina un maggiore grado di polarità negativa , rendendo quindi più "difficile" il raggiungimento della soglia dei – 55mV che dà il via a tutto il processo.
Scopo della presente sperimentazione è stato quello di verificare l'efficacia clinica del bromuro di potassio somministrato per via orale nel controllo delle interazioni sociali di suini sottoposti a raggruppamento e nel mantenere una condizione di maggiore calma nei gruppi nei giorni seguenti alla loro creazione.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta su 4 boxes adiacenti di suini in fase di ingrasso – del peso di circa 70 kg – nei quali sono stati introdotti 16 capi (8 maschi castrati e 8 femmine) ciascuno, omogenei per peso e genetica.
I gruppi di animali trattati e di controllo erano costituiti da suini ibridi commerciali, 50% maschi e 50% femmine, dell'età di 150 giorni circa.
Questi suini sono stati alimentati al truogolo con una broda liquida composta di mangime ed acqua due volte al giorno. I mangimi somministrati sono stati uguali per tutti i boxes, ed equivalenti a quelli normalmente utilizzati nell'allevamento per quella età.
I primi due boxes sono stati sottoposti al trattamento con bromuro di potassio (Sintokalm™ , Sintofarm s.p.a, Guastalla RE), i secondi due hanno avuto funzione di controllo. Di questi 4 boxes sono stati sottoposti ad osservazione i primi due fra loro contrapposti (uno in fronte all'altro), mentre i restanti due estremi sono serviti da serbatoio per l'evento stressogeno (rimescolamento degli animali).
Nei due boxes trattati il bromuro di potassio è stato introdotto manualmente, previa opportuna diluizione con acqua nel truogolo, pochi minuti prima della somministrazione del pasto, garantendo in tal modo l'esatta posologia ed una accurata distribuzione nella massa alimentare.
Nei due boxes di controllo non trattati veniva effettuato un passaggio umano nel box per creare lo stesso elemento di stimolo negli animali.
Il regime di dosaggio per i due boxes è stato di (KBr) 100 mg/kg p.v. (equivalente a 40 g. di Sintokalm™ per 100 kg di p.v.) suddiviso in due somministrazioni giornaliere per i primi 7 giorni di esperimento, e di (KBr) 50 mg/kg p.v. (equivalente a 20 g. di Sintokalm™ per 100 kg di p.v.) per i restanti sette giorni.
La valutazione dell'effetto del bromuro di potassio è avvenuta attraverso una ripresa fotografica dei due box in osservazione, uno di controllo non trattato e l'altro sperimentale,

con apposito macchinario, consistente in due telecamere WiFi collegate via radio con un computer. Le fotografie venivano scattate ogni 10 minuti dalle 7,30 alle 20,30 per tutti i 14 giorni dell'esperimento. In totale quindi ogni box è stato fotografato 79 volte al giorno.
Per simulare un effetto stressogeno comune negli allevamenti suinicoli, il giorno 7 (prima delle 7,30 della mattina) 8 suini (4 maschi e 4 femmine) provenienti dai boxes adiacenti sono stati scambiati con altrettanti suini provenienti dai box in osservazione, creando quindi le condizioni per una nuova lotta di gerarchia.
L'esame delle immagini raccolte nel computer, raggruppate in quattro fasi distinte, è stato effettuato alla fine del periodo sperimentale di 14 giorni distinguendo rispettivamente:

a) I primi due giorni di accasamento (totale: 158 immagini)
b) Il quarto giorno di somministrazione (totale: 79 immagini)
c) I tre giorni successivi all'evento stressogeno (totale: 237 immagini)
d) I due giorni finali dell'esperimento (totale: 158 immagini)

È stato assegnato un "Indice di calma" (IC) ottenuto dalla somma dei punteggi di ogni singolo animale, secondo il seguente schema:
Punti 1. L'animale dorme o è coricato
Punti 2. L'animale è in piedi senza particolari attività
Punti 3. L'animale cammina, o mangia, o grufola, o beve, o è comunque intento in qualcosa
Punti 4. L'animale mostra interesse verso un suo simile e interagisce

Figura 1. *Soggetti addormentati, nessuna interazione: punteggio 16*
Image 1. *Pigs sleeping, no interaction: score 16*

Figura 2. *Undici capi addormentati (punteggio 1), un capo in piedi (punteggio 2), un capo beve (punteggio 3), tre suini interagiscono (punteggio 4): punteggio totale 28.*
Image 2. *Eleven pigs sleeping (score 1),one head standing (score 2), one pig drinking (score 3), three heads interacting (score 4): total score 28.*

RISULTATI

Il risultato delle osservazioni delle immagini è riportato in tabella:

Tabella 1 . *Indici di calma ottenuti. In grassetto i valori per capo.*
Table 1. *Calm indexes obtained. In bold values per head.*

	Primi due giorni (G1-G2)	Quarto giorno (G4)	Tre giorni dopo mixing (G7-G8-G9)	Ultimi due giorni G13-G14	Tutti i risultati
Bromuro di K	19.63 – **1,23**	19.90- **1,24**	20.23- **1,26**	20.15-**1,26**	20.04-**1,25**
Controllo	20.46- **1,28**	21.55- **1,34**	22.57- **1,41**	21.80- **1,36**	21.74- **1,36**
Significatività (*)	P = 0,171 (NS)	P = 0,09 (NS)	P = 0,0005	P = 0,03	P = 0,000003

(*) ANOVA One way, analisi della varianza ad un fattore, software: Microsoft Excel

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Nelle condizioni sperimentali descritte la somministrazione preventiva di bromuro di potassio ad animali sottoposti a raggruppamento e mescolamento ha certamente indotto un comportamento più quieto dei suini ed una maggiore facilità di adattamento alla nuova situazione sociale.
Tuttavia occorre rilevare che l'effetto calmante è risultato relativamente blando, non essendosi osservato alle dosi utilizzate nessun effetto tipicamente sedativo, con riduzione dei consumi alimentari e visibile incremento del tempo destinato al sonno.
Inoltre il tempo di reazione (osservazione di diversità di comportamento tra il gruppo di controllo e quello trattato) è risultato intorno ai tre-quattro giorni dall'inizio del trattamento: pertanto la somministrazione di KBr come intervento di urgenza (attendendosi di conseguenza effetti immediati) non appare, alla luce di questi risultati, particolarmente consigliabile.
Al contrario l'elevata significatività nelle differenze di comportamento osservate tra i due gruppi sul lungo periodo lascia intravedere l'uso probabilmente più proficuo per questo nuovo strumento terapeutico resosi disponibile nella pratica suinicola: un intervento su tempi di somministrazione prolungati (con posologie adattate), allo scopo di creare uno stato generale di maggiore quietitudine in quegli allevamenti in cui siano presenti in forma recidivante problematiche connesse a sovreccitazione degli animali difficili da risolvere con le tecniche tradizionali, senza influenzare in alcun modo l'assunzione alimentare e senza preoccupazioni relative ai tempi di sospensione.

BIBLIOGRAFIA

Trepanier L.A., Babish J.G. (1995) "Effect of dietary chloride content on the elimination of bromide by dogs" , Research in Veterinary Science, 58, 252-255
Trepanier L.A., Babish J.G. (1995) "Pharmacokinetic properties of bromide in dogs after the intravenous and oral administration of single doses , Research in Veterinary Science, 58, 248-251
Plumb CD. "Veterinary Drug Handbook" 3° Edition, Iowa State Univ. Press, 82-84
March P.A., Podell M., Sams R.A. (2002) "Pharmacokinetics and toxicity of bromide following high-dose oral potassium bromide administration in healthy Beagles" J.Vet Pharmacol. Therap, 25, 425-432
Adams R.H. "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" 7° Edition, Iowa State Univ. Press, 384-385
Grewal M.S., Ewart A., Jensen V., Goodman L.S. (1954) "Correlation between anticonvulsant activity and plasma concentration of bromide" , Pharmacol Exp Ther. 112: 109-115
Bito L.Z., Bradbury W.B., Davson H. (1966) "Factors affecting the distribution of iodide and bromide in the central nervous system" ,J Physiol., 185, 323-354
Baird Hastings A., van Dyke H.B. (1931) "Studies of bromide distribution in the blood", J. Biol. Chem, 13-32
Dowling P.M., (1994) "Management of canine epilepsy with phenobarbital and potassium bromide", Can. Vet. Journal, 724-725
Bizzetti M. Sgorbini M., Demi S. (2002) "Impiego del bromuro di potassio in cani epilettici. Studio retrospettivo su 30 casi" , Annali dell'Università di Pisa, 59-66

Grasso A. (2011) “Elogio del bromuro nell’era del Viagra”, Corriere della Sera, 18-9-2011, 9
Podell M., Fenner W. R., (1993) “Bromide therapy in refractory canine idiopathic epilepsy”, Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol 7, 5, 318-327
Trepanier L.A., (1995) “Use of bromides as an anticonculsivant for dogs with epilepsy”, JAVMA, Vol 207, 2, 163-165
Trepanier L.A., Van Schoick A., Schwark W.S., Carrillo J., (1998) “Therapeutic serum drug concentrations in epileptic dogs treated with potassium bromide alone or in combination with other anticonvulsants: 122 cases (1992-1996), JAVMA, Vol 213, 10, 1449-1453
Chang Y., Mellor D.J., Anderson T.J., (2006) Idiopathic epilepsy in dogs: owner’s perspectives on management with phenobarbitone and/or potassium bromide, Journal od Small Animal Practice, 47, 574-581
Woody R.C.,(1990) “Bromide therapy for pediatric seizure disorders intractable to other antiepileptic drugs” , Journal od Child Neurology, 5, 65-67
Boothe D.M., George K.l., Couch P., (2002) “Disposition and clinical use of bromide in cats” JAVMA, Vol 221, 8, 1131-1135
Van Erp-Van der Kooij E., (2003) “Coping behaviour in pigs – consequences for welfare and performance” , Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 1-138

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AL VIRUS PRRS: STUDIO DI CAMPO

DEVELOPMENT OF THE IMMUNE RESPONSE TO PRRS VIRUS: A FIELD STUDY

[1]DOTTI S., [2]GUADAGNINI, G., [2]SALVINI F., [1]RAZZUOLI E., [1]FERRARI M., [1]ALBORALI GL., [1]AMADORI M.

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Brescia;* [2]*DVM, PigVet, Brescia*

Parole chiave: PRRS, IFN-γ, infezione di campo
Key Words: PRRS, IFN-γ, field infection

Riassunto. La PRRS si può manifestare con una gravità della sintomatologia differente; questo aspetto sottolinea la complessità di tale patologia. Questa caratteristica determina pertanto una certa discrepanza tra dati ottenuti durante infezioni sperimentali (condizioni controllate) e quelli osservati in allevamenti commerciali. Inoltre, si possono rinvenire isolati differenti, che possono essere caratterizzati da una patogenicità autonoma o dipendente da interazioni microbiche ed ambientali. In questo studio, 60 scrofette, di 28 giorni di vita (T0), sono state osservate in condizioni di campo. I campioni di sangue sono stati prelevati da T0 a T180 e sono stati analizzati per: viremia (RT-PCR), anticorpi (ELISA) e livelli plasmatici di IFN-γ PRRSV specifici (ELISA). Scopo della prova è stato valutare l'evoluzione della risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata nei soggetti esposti a contatto naturale con il virus della PRRS. Relativamente ai dati ottenuti, risulta che la risposta immunologica adattativa cellulo-mediata delle scrofette nei confronti di PRRSV in azienda sia peggiore di quella osservata in condizioni sperimentali in animali della stessa età e razza, mantenuti in strutture isolate ed in condizioni controllate.

Abstract. PRRS was shown to occur in many different forms, which underlies the complex pathogenesis of this disease and the accumulation of conflicting reports related to both field trials and protocols of experimental infection. On the whole, the emerging picture outlines a multi-factor disease in which PRRSV strains show different features of pathogenicity and agonist interaction with both microbial and non-microbial environmental parameters. In the present study sixty, 30-day old pigs (T0), were observed under field conditions. Blood samples were collected from T0 to T180 and analyzed for: viremia (PCR), antibodies (ELISA) and PRRSV-specific IFN-γ release (ELISA). In this respect, the central hypothesis of our study was that the adaptive immune responses of pigs to PRRS virus on farm could be worse than those observed under experimental conditions in age and breed-matched animals kept in isolation facilities. In this respect, our results indicate that most pigs develop no PRRS virus-specific IFN-γ response, rather than a delayed and erratic response, observed in models of experimental infection.

INTRODUZIONE. La mancanza di una conoscenza completa dell'interazione tra PRRSV e ospite è una delle cause principali nell'insufficiente controllo della malattia. In particolare, il virus della *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome* (PRRSV) mostra come entrambe le componenti: infettiva e manageriale (condizioni igienico-sanitarie) giochino un ruolo importante nella manifestazione di una sintomatologia più o meno grave. La variabilità genotipica del virus impedisce un corretto sviluppo/attivazione della risposta immunitaria sia umorale (anticorpi

neutralizzanti) sia cellulo-mediata (secrezione di citochine infiammatorie). Per questo motivo, i metodi diagnostici classici, spesso, non sono sufficienti per una corretta e completa valutazione della risposta immunitaria degli animali. Numerosi studi sono basati sull'analisi di diversi parametri, al fine di trovare il sistema ed il campione biologico più idonei: saliva e plasma come alternativa al siero (3). Essi, infatti, potrebbero essere di ausilio per una migliore comprensione della patogenesi del virus e, quindi, della risposta dell'ospite nei confronti dell'infezione.
Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare 60 scrofette in condizioni di campo, divise in due gruppi, effettuando prelievi ematici mensili dallo svezzamento a 28 giorni (T0) fino a 180 giorni di vita (T180) per il gruppo 1 e fino a 120 giorni (T120) per il gruppo 2, rispettivamente. Il sangue ottenuto è stato trattato al fine di recuperare sia siero sia plasma per un'analisi dei differenti parametri PRRSV specifici: viremia, anticorpi e IFN-γ.

MATERIALI E METODI. Animali. I soggetti provenivano da un allevamento multisito del Nord Italia. Il sito 1 rappresentato dalle scrofe in fase di gestazione e al parto, suinetti sottoscrofa; sito 2, suinetti in svezzamento (fino a circa 30 Kg); sito 3, suini nella fase di magronaggio-ingrasso (dai 30 ai 170 Kg). Il mangime per le scrofe ed i soggetti in ingrasso era prodotto in azienda, mentre per i suinetti in svezzamento era acquistato all'esterno. I soggetti sono stati sottoposti a misure di immunoprofilassi, effettuate con vaccino inattivato contro: *Porcine Circovirus type* II (18-20 giorni di vita), *Mycoplasma hyopneumoniae* (35-40 giorni di vita); con vaccino vivo attenuato: *Alphaherpesvirus* (come da normativa nazionale). Tutte le scrofe erano vaccinate contro: *Alphaherpesvirus, Parvovirus* ed *Erysipelothrix rhusiopathise*. Inoltre, le scrofette erano immunizzate con vaccino vivo attenuato per PRRS ad un peso di 60-70 Kg, nel momento in cui venivano spostate al sito 3. Una volta raggiunti i 140 Kg di peso corporeo, le scrofette erano riportate al sito principale, dopo essere state testate per la presenza di PRRSV (siero) ed anticorpi sia per PRRS sia per malattia di Aukeszky.
Per l'esecuzione dello studio, sono stati individuati due gruppi (1 e 2) costituiti da 30 scrofette da rimonta ciascuno della stessa età e svezzate a 30 giorni di vita. Allo svezzamento (T0), agli animali sono state applicate le marche auricolari e sono stati eseguiti prelievi di sangue (Vacuette, Greiner, Austria) con e senza litio-eparina. Gli animali del gruppo 1 (corrispondenti ai numeri dall'1 al 30) sono stati visitati ed i prelievi di sangue sono stati eseguiti a cadenza mensile per 6 mesi. I soggetti del gruppo 2 (dal 31 al 60) sono stati inclusi nella prova con un secondo arrivo di scrofette, 60 giorni dopo quelle del gruppo 1, e sono state osservate per un totale di 4 mesi con la medesima cadenza mensile dei prelievi ematici. I campioni in totale erano in numero di 331.
Prove di laboratorio. Il siero, ottenuto per centrifugazione dalle provette senza litio-eparina, è stato utilizzato per una valutazione sia dell'immunità umorale (ELISA IgG) sia per la presenza di RNA ascrivibile a PRRSV (RT-PCR). Gli anticorpi IgG nei confronti della PRRS sono stati evidenziati mediante l'utilizzo di kit IDEXX, seguendo le indicazioni del produttore. Per quanto riguarda la valutazione della viremia, è stata impiegata una Real-Time RT-PCR, come descritto in Revilla-Fernandez et al., 2005. Il sangue intero, ottenuto dalle provette contenenti litio-eparina, è stato utilizzato per la quantificazione di IFN-γ plasmatico mediante una reazione di ELISA sandwich (2). Brevemente, la metodica prevede il contatto del sangue intero, rispettivamente, con PRRSV (BS114S, isolato di campo), PBS e lisato di cellule MARC-145 in una piastra a 48 pozzetti in tre pozzetti distinti per ciascun campione. La piastra è stata successivamente incubata per 20 ore a 37°C e 5% di CO_2. Il rilascio di interferon-gamma nei 3 pozzetti è stato poi valutato mediante ELISA *sandwich*. 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 statistica è stata eseguita mediante test del Chi-quadro (frequenza di reattori positivi nel saggio PCR), analisi della varianza ad 1 via (ANOVA) (titoli di anticorpi sierici).

RISULTATI. Due settimane dopo l'introduzione dei soggetti nel sito 2 (T0), 22 dei 29 soggetti del gruppo 1 sono risultati positivi in PCR, mentre 20 animali hanno presentato IgG specifiche per il virus della PRRS, rilevabili mediante tecnica ELISA. Nei campionamenti successivi tutti gli animali, tranne 1, si sono positivizzati ed hanno mostrato presenza di anticorpi. La prevalenza della viremia tende a diminuire nel gruppo 1 tra il T0 ed il T90, con un aumento tra T90 e T180; al contrario, nel gruppo 2 la prevalenza diminuisce tra T90 e T120 (Chi quadro $p<0.01$). La presenza di anticorpi IgG ha presentato un aumento significativo tra T90 e T120 in entrambi i gruppi (ANOVA per misure ripetute $p<0.01$). 331 campioni di sangue intero provenienti da entrambi i gruppi sono stati analizzati nel saggio di rilascio di IFN-γ plasmatico, tra questi 11 non sono stati analizzati, poiché il quantitativo di sangue presente nelle provette non era sufficiente per lo svolgimento delle analisi. Dei 320 campioni rimasti, 4 sono risultati positivi, 19 dubbi ed i restanti negativi. Nella gran parte dei casi i campioni sono stati considerati negativi, in quanto il livello di IFN-γ prodotto dopo contatto con il criolisato cellulare (MARC-145) era maggiore rispetto a quello indotto dal contatto con PRRSV. Pertanto tale dato è stato valutato come una risposta di tipo aspecifico e non correlato all'infezione con l'agente eziologico indagato.

DISCUSSIONE. Le sperimentazioni effettuate hanno evidenziato che gli animali sono venuti a contatto con il virus ed hanno sviluppato una risposta anticorpale, non mostrando, nella gran parte dei casi, una risposta in IFN-gamma virus-specifica.
All'interno dei due gruppi, in particolare nel gruppo 1, vi sono state ondate di infezioni successive, dovute sia alla presenza del virus di campo sia alla vaccinazione (T90-T120); il terzo rilevamento viremico ha coinciso con il ritorno delle scrofette al sito 1, tale fenomeno potrebbe aver rappresentato un agente stressante in grado di riattivare una pregressa infezione. Nonostante questi continui stimoli del sistema immunitario, la risposta nel rilascio di IFN-γ plasmatico PRRSV-specifico è risultata negativa nel gruppo 1, mentre nel gruppo 2 ha evidenziato un aumento di campioni dubbi/positivi al T120, in corrispondenza della vaccinazione contro PRRS. Vista la prevalenza molto bassa di risultati positivi in IFN-γ PRRSV-specifici e l'elevata prevalenza di anticorpi positivi, sono emersi dubbi relativi all'attendibilità del metodo utilizzato (ELISA *sandwich*). Pertanto, al fine di escludere qualsiasi incertezza inerente la procedura, la stessa metodica è stata impiegata per valutare la risposta IFN-γ specifica in suini vaccinati contro *Alphaherpesvirus*. In questo caso, al contrario di quanto osservato per PRRS, la prevalenza di soggetti IFN-γ positivi è risultata assai elevata e, quindi, in linea con la risposta tipica del virus in esame (5).
Da questi dati sembrerebbe emergere un'ulteriore prova della scarsa attivazione della componente cellulare in corso di infezione con PRRSV. Un altro aspetto da prendere in considerazione è rappresentato dalla discrepanza che si rileva tra le infezioni sperimentali e quelle di campo, dove variazioni più o meno evidenti sono imputabili alla presenza di *stressors* ambientali e manageriali (6). Per questo motivo, i dati ottenuti dalla prova possono rappresentare anche una valutazione dei valori sopra menzionati in associazione a condizioni ambientali normalmente presenti in allevamento.

CONCLUSIONI. I risultati emersi da questa prova hanno evidenziato una buona risposta umorale nei confronti del virus della PRRS, come descritto anche da altri (1, 8), ma gli stessi animali non hanno mostrato una risposta di tipo cellulo-mediato, nonostante vi sia stato un contatto ripetuto con l'agente virale (vaccinazione e infezione naturale). Inoltre, la tempistica dell'ultimo contatto

con il virus, poco prima dell'inseminazione delle scrofette e la mancata attivazione del sistema citochinico, è un elemento di particolare rilievo per i possibili effetti negativi sulla successiva gravidanza. La prevalenza altalenante dei soggetti positivi in PCR rispetto alla prevalenza dei soggetti con presenza di IgG specifiche per virus PRRS e la conseguente discrepanza fra i due parametri, risulta in linea con quanto osservato anche da altri autori (9). Tale risultato potrebbe essere imputato ad un differente profilo di replicazione virale e di interazione virus/ospite in momenti successivi dopo l'infezione. Un aspetto interessante è rappresentato dalla valutazione del saggio di rilascio di IFN-γ, dove si nota una mancata risposta PRRSV-specifica; tale risultato è discordante rispetto a quanto evidenziato con dati ottenuti mediante metodica ELISpot (1). Questo dato potrebbe essere dovuto alla differente procedura di esecuzione delle due procedure; tale aspetto andrà pertanto approfondito mediante comparazione tra i due test. In ogni caso, viene messa in luce una scarsa attivazione citochinica, non in grado di limitare l'infezione virale ed il successivo possibile sviluppo della malattia (4). Inoltre, questa scarsa attivazione pone un limite anche all'attività dei vaccini normalmente impiegati in allevamento, con indubbie ripercussioni sulle possibilità di un controllo efficace della malattia (10).

BIBLIOGRAFIA.

Darwich L., Diaz I., Mateu E. (2010) "Certaines, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology". Virus Res. 154, 123-132.

Dotti S., Villa R., Sossi E., Guadagnini G., Salvini F., Ferrari M., Amadori M. (2011) "Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs". Res. Vet. Sci. 90, 218-225.

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. 154(1-2), 170-6.

Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine". Virus Res. 154(1-2), 1-6.

Małgorzata P.M., Iwona M.D. (2010) "Interferon-c secretionand proliferative responses of peripheral bloodmononuclear cells after vaccination of pigs against Aujeszky's disease in the presence of maternal immunity". FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58(3), 405-411.

Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F. (2002) "Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection". Viral Immunol. 15, 533-547.

Revilla-Fernandez S., Wallner B., Truschner K., BenczaK A., Brem G., Schmoll F., Mueller M., Steinborn R., (2005) "The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen". J. Virol. Methods 126, 21-30.

Sang Y, Rowland RR, Blecha F. (2011) "Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Anim Health Res Rev. 12(2), 149-67.

Stadejek T., Jablonski A., Chabros K., Skrzypie, E., Pejsak Z. (2011) "Analysis of circulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in 22 Polish pig farms: implications for diagnosis and control". In: "2011 International PRRS Symposium , Chicago, 2-3 December 2011" 25-26.

Thanawongnuwech R., Suradhat S. (2010) "Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design". Virus Res. 154(1-2), 133-40.

ACCLIMATAMENTO DELLE SCROFETTE NEI CONFRONTI DELLA PRRS; CONFRONTO DI QUATTRO DIFFERENTI METODOLOGIE PER LA VERIFICA DELLA PRESENZA DI PRRSV E ALTRI PATOGENI RESPIRATORI NEI GRUPPI DI RIMONTA

PRRS GILT ACCLIMATION ; A COMPARISON OF FOUR DIFFERENT METHODS TO SCREEN FOR PRRSV AND OTHER RESPIRATORY PATHOGENS IN DIFFERENT BATCHES

SANDRI G.[1], GIOVANARDI D.[2], PESENTE P.[2], SPERATI-RUFFONI L.[2] , PERINI F.[2] , ROSSI G. [2]

[1] Agricola Tre Valli, Quinto di Valpantena (VR); Gianpietro_sandri@veronesi.it
[2] Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina
S.Martino Buonalbergo (VR) (3) Veronesi Mangimi, Quinto di Valpantena (VR)

Parole chiave: Acclimatamento scrofette, PRRSV, raschiato tonsillare, fluidi orali, lavaggio bronco-alveolare, PCR
Key words: Gilt acclimation, PRRSV, tonsil scraping, oral fluids, bronchoalveolar lavage, PCR

Riassunto: L'acclimatamento delle scrofette di rimonta nei confronti di PRRSV è un punto cruciale per un buon controllo della malattia nella scrofaia. Il lavoro descrive il processo di acclimatamento per contatto dei gruppi di scrofette di una grande scrofaia e delle procedure/analisi di controllo poste in atto per verificare la riuscita di tale programma. Per verificare che non ci siano animali portatori/eliminatori al momento dell'ingresso vero e proprio in scrofaia si è utilizzata non solo la normale sierologia ma anche PCR per PRRSV eseguite a partire da diverse matrici quali sangue, raschiato tonsillare, fluidi orali e liquido da lavaggio bronco-alveolare. Contemporaneamente le stesse matrici sono state testate anche per Influenza, M. hyopneumoniae e M. hyorhinis
Abstract: Gilt acclimation for PRRS is crucial to achieve a good control of this disease in the sow herd. This paper describes the protocol of gilt acclimation by direct contact used in large sow herd and the control protocol and diagnostic tests used. To avoid the introduction of carrier/shedder animals we used not only serology but also a PRRS-PCR performed starting from different matrix such as blood, tonsil scrapings, oral fluids and broncho-alveolar lavage fluids. At the same time starting from the same matrix we also tested for the presence of Swine Influenza, M. hyopneumoniae and M. hyorhinis

INTRODUZIONE

L'introduzione regolare di un grande numero di scrofette in allevamento scrofe rappresenta sicuramente e per molti versi uno dei maggiori problemi che il veterinario aziendale si trova oggigiorno ad affrontare. In particolare, dopo la comparsa della PRRS, la preparazione ed introduzione delle scrofette di rimonta è sicuramente uno dei punti (il punto) più critico nell'ambito della programmazione sanitaria nell'allevamento di scrofe. Se tralasciamo le (poche) scrofaie PRRS negative – che ovviamente devono introdurre scrofette PRRS negative – nella pratica quotidiana si possono riscontrare le più diverse situazioni in base a numero, età e frequenza di introduzione ed ovviamente in base allo stato sanitario dell'allevamento ricevente e dell'allevamento fornitore/

produttore. L'introduzione di scrofette PRRS positive, anche in allevamenti già positivi, è uno dei casi più frequenti anche se, a parere degli autori, è sicuramente tra i più "rischiosi". Infatti molto spesso non è possibile di discriminare se le scrofette di nuova introduzione siano anche *portatrici* (carrier) e/o *eliminatrici* (shedder) di PRRSV. Tuttavia anche l'introduzione di scrofette PRRS negative in scrofaia PRRS positiva rappresenta un "problema" di non facile soluzione. Molti autori sono concordi nello sconsigliare l'introduzione diretta di scrofette – quale che sia la loro età – in allevamento e suggeriscono l'adozione di una specifica procedura di isolamento/accrescimento e preparazione/introduzione. Dopo la fase di controllo o quarantena vera e propria, che deve essere fatta in strutture fisicamente e gestionalmente separate, le successive fasi possono essere organizzate e gestite in maniera differente in base alla disponibilità e di ambienti e all'organizzazione delle varie aziende. Lo scopo rimane comunque quello di fornire alle scrofette (PRRS negative) in entrata un qualche tipo di immunità nei confronti di PRRSV. Tale immunità può essere più semplicemente stimolata mediante vaccinazione con vaccini vivi-modificati e/o spenti eventualmente in combinazione. Il grado di protezione fornito dal solo programma vaccinale è perlomeno limitato per cui molto spesso si ricorre a programmi di "immunizzazione naturale" che prevedono "l'esposizione " delle scrofette al PRRSV specifico/omologo della scrofaia di destinazione. Il punto cruciale rimane comunque quello di evitare l'introduzione di scrofette di rimonta portatrici e/o eliminatrici di PRRSV per cui è necessaria una procedura di controllo pre introduzione. A tale scopo la sola sierologia è ampiamente insufficiente ed è meglio affiancare anche altre tecniche diagnostiche quali la PCR. La PCR per PRRS oltre che sull' emosiero può essere effettuata su diverse matrici/tessuti di più o meno facile ottenimento. A tale fine negli ultimi anni sono state sperimentate e valutate diverse tecniche. Il raschiato tonsillare (oro-faringeo) ed il lavaggio bronco-alveolare si sono dimostrati particolarmente "sensibili" ma la tecnica di raccolta è sicuramente indaginosa e non applicabile su larga scala. I fluidi orali raccolti mediante apposite corde appese nei box che vengono succhiate dalle scrofette possono rappresentare una valida alternativa per controllare anche grandi numeri e non solo per PRRSV.

MATERIALI E METODI.

La scrofaia oggetto di questo lavoro è una scrofaia di notevoli dimensioni – PRRS positiva – che introduce un nuovo gruppo di scrofette di rimonta ogni quattro settimane ovvero 13 gruppi l'anno. Ogni gruppo di rimonta consiste di ca. 280 scrofette di 21-24 giorni di vita provenienti da un moltiplicatore esterno PRRS negativo. Le giovani scrofette sono ospitate in una *fase di quarantena/svezzamento* separata dalla scrofaia, composta da tre ambienti di svezzamento indipendenti che lavorano TP/TV, dove permangono per circa 50-60 giorni. Successivamente vengono trasferite in una vicina *fase di accrescimento* che consiste di due ambienti separati ma gestiti a flusso continuo; normalmente sono sempre presenti almeno tre diversi gruppi/età di animali che vanno dagli 80 ai 180 giorni di vita circa. In questa fase oltre alle vaccinazioni specifiche si cerca di mantenere sempre una certa circolazione di PRRSV specifico di allevamento eventualmente ricorrendo all'introduzione di suinetti svezzati. Al compimento del sesto mese di vita circa le scrofette vengono finalmente introdotte in un apposito reparto della scrofaia dove vengono completate le vaccinazioni ed iniziato il programma di stimolazione e ricerca calori. Per verificare lo status del programma di acclimatamento scrofette a novembre 2011 sono stati controllati tre gruppi di scrofette di varie età come specificato nella seguente tabella.

Tabella 1. Gruppi di scrofette sottoposte ad indagine e relativa età e fase di allevamento
Table 1. Groups gilts undergoing testing and their relative age and place

gruppo	*età*	*fase*
C 78 (lug. 11)	110 gg	Entrate in Accrescimento/acclimatamento da 4 settimane
C 76 (mag.11)	170 gg	In Accrescimento/acclimatamento da ca.14 settimane
C 74 (mar.11)	230 gg	Spostate nella Stimolazione della scrofaia da ca. 8 settimane

Da ciascuno di questi tre gruppi di scrofette sono stati scelti a caso 3 box dove sono state appese delle corde in canapa della lunghezza di ca. 30-40 cm. affinché potessero essere succhiate dalle scrofette stessee si potessero successivamente raccogliere i fluidi orali (saliva). Le corde sono rimaste a disposizione delle scrofette per 30 min. circa e successivamente raccolte in appositi sacchetti sterili. Una volta giunte in laboratorio da ciascun gruppo di corde si sono raccolti, mediante strizzatura, 3-5 ml. di saliva che sono stati successivamente sottoposti alle analisi di seguito descritte. Contemporaneamente, sempre dagli stessi 3 box dei tre gruppi di scrofette, sono state scelte a caso nove animali. Ciascuna delle nove scrofette è stata adeguatamente immobilizzata e sottoposta a prelievo di sangue. In successione, con utilizzo di apposito morso apribocca si è provveduto a effettuare il raschiato della tonsilla palatina e il lavaggio bronco-alveolare. Per ottenere il raschiato è stato utilizzato un apposito cucchiaio Cuzzi dal quale è stato poi prelevato un frustolo di tessuto tonsillare mediante tampone rayon (Copan Italia).Tra un animale ed il successivo il cucchiaio veniva lavato e sterilizzato a fuoco utilizzando un apposito becco flambatore. I tamponi refrigerati sono stati consegnati al laboratorio nell'arco di poche ore e sottoposti agli esami di seguito descritti. Per effettuare il lavaggio bronco-alveolare è sta scelta la tecnica con accesso al polmone per via orale (Scollo et al. 2011) utilizzando sonde monouso della lunghezza di circa 90 cm. Una volta raggiunte le vie aeree profonde sono stati introdotti 15 ml di soluzione fisiologica isotonica che è stata successivamente aspirata utilizzando una siringa sterile monouso da 20 ml. Il liquido venuto a contatto col parenchima polmonare o BALF – solitamente di un volume variabile da 2 a 6 ml – veniva raccolto in provette sterili, refrigerato ed inviato anch' esso in laboratorio per essere sottoposto agli esami descritti nella seguente tabella.

Tabella 2. Matrici prelevate ed elenco degli esami di laboratorio
Tab.2. Specimen obtained and list of laboratory exams performed

	C 78	**C 76**	**C 74**
Sangue	Sierologia + PCR per PRRS	Sierologia + PCR per PRRS	Sierologia + PCR per PRRS
Raschiato tonsillare	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU
Fluidi orali (saliva)	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU	PCR per PRRS e FLU
BALF	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis	PCR per PRRS e FLU PCR per M.Hyo e M.hyorinis

Per la sierologia PRRS è stato utilizzato il kit IDEXX PRRS X3.

Estrazione di RNA virale e del DNA di Mycoplasmi

L'RNA è stato estratto dai pool di sieri, dei raschiati oro-faringei, dei fluidi orali e dai pool di lavaggi bronchiali, utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germania) in accordo con le istruzioni del produttore. Da raschiati oro-faringei e dai lavaggi bronchiali è stato anche estratto il DNA tramite l'utilizzo del kit DNeasy Tissue kit (Qiagen**).**

Ricerca PRRSv e Influenza A

Per la ricerca del virus della PRRS è stata utilizzata una Multiplex one-step RT-PCR, che amplifica una regione comprendente una parte dell'ORF6 e l'intero ORF7. Sono stati utilizzati i primer P72 (Guarino *et al*.; 1999), Olek-F (Oleksiewcz *et al*. ; 1998), EU6-343-F e EU7-340-R (Revilla-Fernandez *et al*. ;2005). Per la ricerca del virus dell'Influenza A è stata utilizzata una One-step RT-PCR, che amplifica una regione codificante per la proteina della matrice del virus. I primer adoperati sono Flu-F e Flu-R (Fouchier R.A. *et al*.; 2000.). Per entrambe le analisi è stato utilizzato il kit "Super Script One-step RT-PCR con platinum Taq" (Invitrogen, USA).

Analisi sequenze genica di PRRSv

I campioni risultati positivi al virus della PRRS sono stati tipizzati tramite analisi della sequenze genica. I prodotti di RT-PCR sono stati inviati al centro BMR-Genomics (Padova) per il sequenziamento e successivamente è stato eseguito uno studio epidemiologico con l'ausilio dei pacchetti informatici GENEDOC version 2.7 e Phylip versione 3.69 . L'albero filogenetico ottenuto è stato visualizzato tramite il software Treeview versione 1.6.6.

Ricerca Mycoplasma hyopneumoniae e M. hyorhinis

Per la ricerca di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* è stata utilizzata una Multiplex PCR. Le coppie di primers utilizzati sono Sp37- Asp37 (Caron et al., 2000) e M.hyop1-F –M.hyop2-R (Calsamiglia M, et al., 1999). La mix di reazione utilizzata è quella contenuta nel kit Multiplex PCR KIT (Qiagen).

RISULTATI

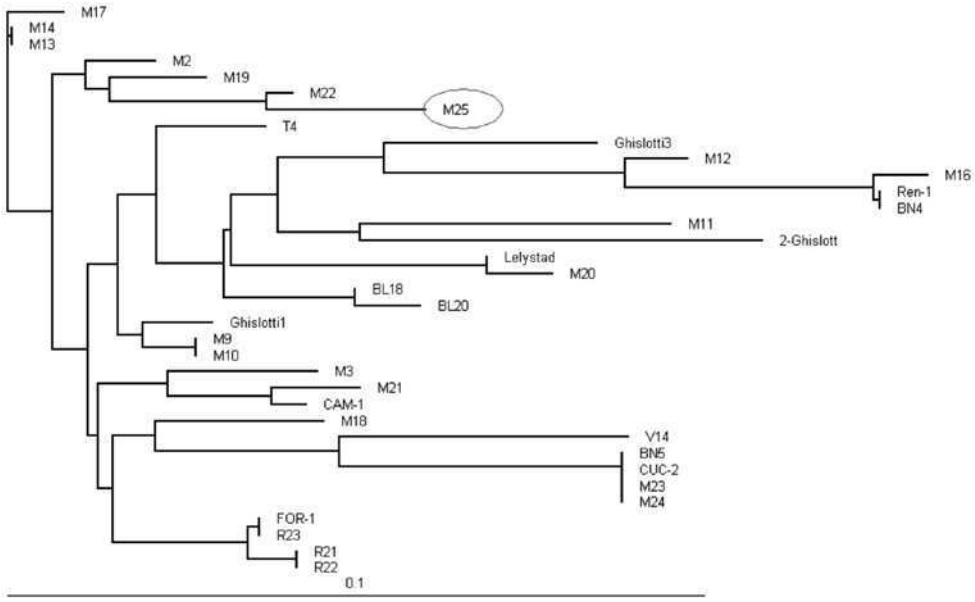
Di seguito vengono elencati i risultati dei vari esami di laboratorio effettuati ma occorre notare che nel gruppo C 74 mancano i risultati della sierologia di una delle nove scrofette prelevate perché la provetta è andata accidentalmente distrutta durante il trasporto/manipolazione.

Tabella 3. Esiti degli esami di laboratorio
Table 3. Laboratory results

	C 78	C 76	C 74
Sangue	PRRS-PCR **neg.** Serol. **5/9 pos.** **(s/p 0,68)**	PRRS-PCR **neg.** Serol. **9/9 pos.** **(s/p 2,60)**	PRRS-PCR **neg.** Serol. **6/8 pos.** **(s/p 1,16)**
Raschiato tonsillare	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**
Fluidi orali (saliva)	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**	FLU-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**
BALF	FLU-PCR **neg.** M.HYO-PCR **pos.1/9** M.hyorinis-PCR **neg.** **PRRS-PCR pos.1/9**	FLU-PCR **neg.** M.HYO-PCR **pos.2/9** M.hyorinis-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**	FLU-PCR **neg.** M.HYO-PCR **neg.** M.hyorinis-PCR **neg.** PRRS-PCR **neg.**

Al fine di ridurre i costi di analisi i campioni di sangue, raschiato tonsillare e fluidi orali prelevati dai tre gruppi di scrofette prese in considerazione sono stati raccolti in pool di tre per tutte le indagini di biologia molecolare. Solamente i BALF dei tre gruppi sono stati sottoposti a PCR individuale per tutte le ricerche (FLU, M.hyo, M.hyorinis e PRRSV). Tutti gli esami sierologici sono stati eseguiti individualmente. Come ci si poteva aspettare, nonostante il gruppo delle scrofette più giovani avesse avuto un'episodio influenzale ad inizio settembre 2011 (SIV-A H1N1) non è stata riscontrata nessuna positività in PCR per quanto riguarda l'influenza (FLU). Anche per M.hyorinis non è stato possibile riscontrare nessuna positività in alcuno dei pool esaminati. M.hyopneumonie è stato riscontrato in uno solo dei nove campioni di BALF del gruppo di scrofette più giovani (C78 – lug11) e in due su nove campioni del gruppo mediano (C76- mag11). Per quanto riguarda PRRS tutti tre i gruppi sono risultati sierologicamente positivi sebbene con prevalenze diverse e diversi valori medi di s/p (vedi Tab.3). Tutti i pool di emosieri sono risultati negativi per PRRSV in PCR, così come sono risultati "curiosamente" negativi anche i raschiati tonsillari (per esperienza personale è solitamente la matrice più sensibile per il ritrovamento di PRRSV) ed i fluidi orali (saliva). Solamente uno dei nove BALF del gruppo delle scrofette più giovani è risultato positivo alla PCR per PRRSV. La successiva sequenza del genoma ha rivelato una omologia del 97% con un ceppo trovato in corso di un precedente episodio di PRRS verificatosi in scrofaia a febbraio 2011 e una bassissima omologia (<90%) col ceppo vaccinale utilizzato.

Fig.1 Albero filogenetico con ceppo M25 isolato da BALF
Fig.1 Phylogenetic tree including strain M25 obtained from BALF



DISCUSSIONE

Il numero di campioni prelevati dai tre gruppi ed il relativo numero di esami di laboratorio eseguiti in rapporto alle dimensioni dei tre gruppi di scrofette non ha consentito nessuna elaborazione di carattere statistico. Per quanto riguarda il rilevamento di PRRSV non siamo quindi in grado di stabilire quale dei quattro sistemi/matrici sia il più adatto/sensibile nell'evidenziare

l'eventuale presenza del virus. Tuttavia l'andamento della sierologia per PRRS (prevalenza di positivi all'interno del gruppo e valori di s/p) e il rilevamento di una PCR positiva da un solo soggetto del gruppo più giovane - da poco entrato nel reparto accrescimento/ condizionamento – ci permette di affermare che il sistema di "acclimatamento per contatto" stava ancora funzionando al momento dei prelievi e consentiva una "adeguata" preparazione delle scrofette prima dell'ingresso in scrofaia senza rilevare scrofette portatrici (carrier) di PRRSV tra gli animali delle due rimonte più vecchie rispettivamente in uscita dalla fase acclimatamento e che erano già in scrofaia fase stimolazione.

CONCLUSIONI

L'eventuale programma di acclimatamento delle scrofette nei confronti di PRRSV – eventualmente accompagnato da programmi vaccinali – deve essere fatto in idonei locali/ reparti separati fisicamente e gestionalmente dalla scrofaia. L'intento di tale programma è quello di fornire alle scrofette una adeguata immunità senza che queste rimangano portatrici/eliminatrici di PRRSV al momento dell'introduzione in scrofaia. Il programma di acclimatamento per contatto descritto in precedenza soddisfa tali requisiti. E' tuttavia necessario che ogni azienda sviluppi un proprio programma di controlli mediante adeguate metodiche di prelievo ed esami di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

SCOLLO A., MAZZONI C., TONON F., BORRI E., RAFFI V., DONNA R., GHERPELLI M. (2011) *Atti della Società Italiana Patologia e Allevamento Suini* XXXVII Meeting Annuale, Piacenza 94-101

GUARINO H. *et al*.; (1999) Detection of Porcine reproductive and rspiratory sindrome virus by reverse transcription polymerase chain reaction usin different regions of the viral genome. *J Vet Diagn* Invest .**11**: 27-33.

OLEKSIEWICZ M. B. *et al*.; (1998) Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol*. **64**: 7-22

REVILLA-FERNANDEZ S. *et al*.; (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *J Virol Methods*. **126**: 21-30.

FOUCHIER R.A. *et al*.; (2000) Detection of Influenza A Viruses from different species by PCR
Amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol*. **38**: 4096-4101

CARON F. *et al*., (2000) "Diagnosis and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infection in pigs by PCR amplification of p36 and p46 genes". J *Clin microb*. Vol **38**, pag.1390-1396.

CALSAMIGLIA M. *et al*., (1999) "Application of nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs", *J Vet Diagn Invest* , vol. **11**, pag 246-251.

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI INFLUENZA (A/H1N1) IN UN ALLEVAMENTO SUINO DA INGRASSO

DESCRIPTION OF AN INFLUENZA (A/H1N1) OUTBREAK IN A PIG FATTENING HERD

BORIOSI G.[1], GUGLIOTTA A[1]., LASAGNA C.[1], FONI E.[2], CHIAPPONI C.[2], DOTTORI M[3]., VILA T.[4], LEOTTI G.[5]

[1]Martini S.p.A., Budrio di Longiano,(FC); [2]IZSLER Parma; [3]IZSLER Reggio Emilia; [4]Merial S.A.S., Lione; [5]Merial Italia, Milano

Parole chiave: suino, Influenza, PRDC, SIV-H1N1, Impatto economico.
Key Words: pig, Influenza, PRDC, SIV-H1N1, Economic impact.

Riassunto. Gli Autori descrivono un focolaio di influenza suina (SI), sotto-tipo H1N1, con sintomatologia a carattere esclusivamente respiratorio, verificatosi in un allevamento da ingrasso (Sito 3) che fa parte di un'importante azienda con organizzazione di allevamento a multi-sito. Il focolaio ha coinvolto suini nelle fasi finali di ingrasso e si è protratto per oltre un mese con coinvolgimento, in momenti successivi, di tutti i settori dell'allevamento. Le ricerche effettuate hanno evidenziato la presenza di virus influenzale, limitati livelli sierici di genoma virale di PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae, Pasteurella multocida.* La diagnosi di influenza si è basata, oltre che su rilievi di natura clinica e anatomopatologica, sull'uso di tecniche di laboratorio (RT-PCR da tamponi nasali, isolamento virale) e anche di un kit rapido che è stato utilizzato direttamente in allevamento (mediante tampone nasale). Gli Autori hanno quantificato in 9-10 €, per ogni suino macellato della stessa banda ingrasso, l'ammontare complessivo dei danni economici indotti da questo focolaio di influenza (A/H1N1).

Abstract. The Authors describe an outbreak of swine influenza (SI), subtype H1N1, with respiratory symptoms mainly, in a fattening herd (Site 3), part of an integrated multi-site organization. The outbreak invested the finishers in the last period of fattening and it spent one month for to finish: all sectors of the herd were affected. Laboratory investigations identified the presence of influenza virus, low serum levels of PCV2 viral genome, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. The diagnosis of swine influenza was based on pathological and clinical findings, laboratory investigations (RT-PCR from nasal swabs, virus isolation), and also a rapid diagnostic kit used on farm (through nasal swabs). The Authors calculated that this outbreak of influenza (type A/H1N1), in its duration, caused an average total loss of €9-10 for each slaughtered pig.

INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza suina (SIV) è da sempre considerato uno dei più importanti agenti eziologici di malattia respiratoria in questa specie animale e ha una diffusione elevata in molti paesi (Van Reeth *et al.,* 2008).

Questo virus, considerato uno degli attori principali del cosiddetto complesso respiratorio del suino (PRDC), ha un'azione patogena primaria e una riconosciuta azione "*door-opener"* come recentemente messo in evidenza in Italia (Gradassi *et al.,* 2009) e 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 questa 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, dove il virus può permanere a lungo e dare luogo a manifestazioni cliniche ripetute nel tempo (Olsen *et al.,*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; Allerson *et al.,* 2011). Un'ampia indagine di campo effettuata recentemente nel nostro paese ha evidenziato una notevole percentuale di diffusione dei virus influenzali nei suini in fase di svezzamento; questi virus sono stati isolati (o messi in evidenza) prevalentemente in seguito a episodi clinici di forme respiratorie; ben il 54% delle positività totali ai SIV era concentrata in suini di questa fascia di età (Gradassi *et al.,*2009). E' utile a tal proposito ricordare che un esteso monitoraggio sierologico di campo effettuato recentemente in Italia ha evidenziato curve di deplezione degli anticorpi anti-SIV di origine materna molto diverse tra i suini degli allevamenti analizzati (Candotti *et al.,*2003).

L'influenza del suino, inoltre, ha spesso delle conseguenze importanti sulla sfera riproduttiva, dove questo 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.,*2006; Bardini *et al.,2011*).

In Italia sono presenti e circolanti tutti e tre i sottotipi di SIV del suino (H1N1, H1N2, H3N2); l'incidenza negli 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 in ogni modo evidenziato una maggior frequenza di H1N2 rispetto al passato (19 isolati sui 54 totali di virus influenzale; 21 H1N1 e 13 H3N2) come 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 ha come metodica di riferimento l'isolamento virale (VI) , che è effettuato sia da organi sia da prelievi eseguiti "in vivo", mediante tamponi nasali (Barigazzi *et al.,* 2003); altre tecniche diagnostiche utilizzate per la diagnosi di SI sono la RT-PCR, sierologia (inibizione dell'emoagglutinazione-IHA ed Elisa), immunofluorescenza, istologia e immunoistochimica.

Lo studio dei virus influenzali si avvale oggi anche di avanzate tecniche di analisi genetica e 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 molto 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 rilevante (Olsen *et al.,* 2006; Gradassi *et al.,*2009), ma non sono molti i lavori reperibili in letteratura che quantificano i danni economici indotti da un focolaio d'Influenza suina (Olsen *et al.,*2006; Madec *et al.,* 1992; Dréau *et al.,*2010). Un lavoro recente pubblicato negli USA (Donovan, 2005) riporta una perdita di $10,31 per suino in seguito a un focolaio di influenza in un sistema di produzione multi-sito.

L'incidenza economica dell'influenza in un allevamento italiano a ciclo-chiuso (situato in un'area dell'Italia settentrionale considerata tipicamente a rischio per l'influenza suina) è già stata oggetto di una comunicazione recente (Bardini *et al.,* 2011) che ha quantificato l'impatto economico complessivo del focolaio (SIV-H1N2) in €129 per scrofa presente.

Scopo degli Autori è stato quello di fornire una valutazione dell'impatto economico di un focolaio di influenza (SIV-H1N1) in un allevamento da ingrasso italiano che si differenzia nettamente da quello di cui sopra per due ragioni: Sito 3 di una struttura organizzativa a multi-sito e collocazione in un'area dell'Italia centrale considerata a basso rischio per l'influenza suina.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche dell'allevamento dove si è verificato il focolaio di influenza

Allevamento da ingrasso con la disponibilità di allevare contemporaneamente oltre 3.000 suini, inclusi nei circuiti dei prosciutti DOP italiani fino all'invio al macello all'età di 9-10 mesi di vita. L'allevamento, situato a pochi chilometri di distanza dal lago Trasimeno (Umbria), è un Sito 3 inserito all'interno di un'importante azienda integrata con organizzazione di allevamento a multi-sito (oltre 20.000 scrofe). L'allevamento è costituito da 5 capannoni (Figura 1) che sono gestiti con completa applicazione della gestione "tutto-pieno/tutto-vuoto". I suini arrivano in azienda a un peso vivo compreso tra i 30-35 kg, con un'età approssimativa di 80 giorni ed inviati al macello a un peso vivo collocato tra 160 e 170 kg. I suini qui allevati provengono da un unico allevamento di svezzamento (Sito 2), a sua volta rifornito da una o due scrofaie (Sito 1). Questa organizzazione del flusso animale permette di garantire un alto livello sanitario e un'elevata omogeneità genetica. I suini, oltre alle vaccinazioni obbligatorie contro il virus di Aujeszky, sono vaccinati allo svezzamento contro PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

I suini qui allevati provengono da Siti 2 e 1 esenti da Malattia di Aujeszky, PRRS positivi(la circolazione di PRRSv nei Siti 1 e 2 è comunque molto limitata) , *Mycoplasma hyopneumoniae* positivi, *Actinobacillus pleuropneumoniae* positivi. L'anamnesi aziendale non riporta la segnalazione di casi precedenti di SI in quest'allevamento. I suini appartenevano a una razza ibrida commerciale.

L'area dove è collocata l'azienda nella quale si è verificato il focolaio di SI, oggetto della nostra comunicazione, è a scarsa densità di popolazione suinicola; l'allevamento più vicino è infatti ubicato a una distanza di circa 2 km e separato dall'allevamento di cui sopra da una collina.

Sistema di raccolta dei dati

Tutti i dati raccolti in allevamento sono stati forniti dai veterinari aziendali e dal proprietario dell'allevamento, 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 eseguire correttamente un prelievo di materiale organico mediante tampone nasale. Il Kit anche di 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 (Virocult®- Medical Wire and Equipment, UK) per le indispensabili ricerche diagnostiche successive.

Accertamenti diagnostici

Gli accertamenti diagnostici sono stati eseguiti in due diversi laboratori:

-IZSLER Parma

Indagini virologiche: sono stati conferiti n°6 tamponi nasali provenienti da suini clinici a fine ingrasso con T° febbrile, che sono stati contrassegnati con numero d'accettazione IZSLER PR 74528. Dopo opportuna omogeneizzazione i campioni sono stati sottoposti a Real Time PCR al fine di evidenziare la presenza del gene M di SIV. Le matrici dei campioni risultati positivi alla Real Time PCR sono state anche sottoposte a Multiplex RT PCR al fine di evidenziare e identificare emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) del sottotipo del virus influenzale presente (Chiapponi *et al.,* 2010). In seguito i campioni sono stati sottoposti a prove di

isolamento virale tramite inoculazione su uova embrionate e colture cellulari, utilizzando le linee stabilizzate CACO2 e MDCK (Chiapponi *et al.,* 2010). Gli isolati virali ottenuti sono stati sottoposti a tipizzazione antigenica tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) utilizzando sieri iperimmuni di referenza e stipiti di campo dei sottotipi H1N2, H3N2, H1N1 e vH1N1 pandemic 2009. Due stipiti isolati dai tamponi n° 3 e 5 sono stati poi amplificati e sottoposti ad analisi genetica per quanto riguarda il gene HA e la regione N1 del gene NA (Figura 2). Inoltre è stato sottoposto ad amplificazione anche il frammento di HA di tipo aviare rilevato nel campione n° 3. Gli allineamenti sono stati realizzati tramite CustalW, gli alberi filogenetici sono stati costruiti con l'utilizzo di software MEGA 3.1.(Kumar S. *et al.,* 2004).
Indagini sierologiche: sono state eseguite due serie di analisi sierologiche per un totale di n° 50 suini, prelevati a distanza di circa uno e due mesi dall'esecuzione dei tamponi nasali di cui sopra. Le analisi eseguite erano le seguenti: Elisa PRRS (IDDEX), inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) per i tre sottotipi di virus influenzali (H1N1 267505/10, H1N1 pandemico, H1N2 284922/09, H3N2 312582/09), Elisa competitiva per anticorpi Aujeszky anti-gE (IDDEX), Elisa competitiva per anticorpi Aujeszky anti-gB(IZSLER BS), Elisa competitiva per anticorpi anti-PCV2 (IZSLER BS), RT-PCR per PCV2 (IZSLER BS), Elisa qualitativa per anticorpi anti *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hypra), Elisa per anticorpi anti *Mycoplasma hyopneumoniae* (IDDEX).

-IZSLER Reggio Emilia
Fu effettuata la valutazione al macello dei punteggi polmonari delle lesioni *Mico-like* secondo griglia Madec (scala dei punteggi: 0-28) e relativo adattamento del metodo per i suini da ingrasso italiani (Ostanello *et al.,* 2007) e delle pleuriti secondo griglia S.P.E.S./A.P.P.I. (Luppi *et al.,* 2011), su un lotto di n° 104 suini appartenenti alla banda coinvolta dall'episodio influenzale.
IZSLER RE ha inoltre eseguito l'esame anatomo-patologico, virologico e batteriologico su un polmone prelevato al macello nel corso dell'esecuzione delle osservazioni di cui sopra.

RISULTATI

Descrizione del caso clinico
I suini appartenenti alla banda coinvolta dal focolaio influenzale erano arrivati nel Sito 3 in data 29-10-10 (n° 3.000) con un peso vivo medio di kg 32,996, un'età di circa 80 giorni e sono stati poi inviati al macello nel mese di maggio 2011. I suini sono stati alimentati con mangime secco e con siero di latte tal quale (SS al 3%), somministrato mediante l'impianto dell'acqua di abbeverata. Tutti i dati zoo-economici relativi a questa banda sono segnalati nella Tabella 1 e sono stati oggetto di annotazione costante e standardizzata. Il primo sospetto clinico di SI fu formulato in data 10-03-11, quando i suini avevano raggiunto un peso vivo medio stimabile attorno ai 140-150 kg. La sintomatologia riscontrata era di natura prevalentemente respiratoria, non particolarmente grave, ma con un'evidente riduzione del sensorio e una riduzione media dell'ingestione alimentare del 45%. Le prime manifestazioni cliniche furono segnalate in un capannone e poi si estesero gradualmente a tutto l'allevamento. Le manifestazioni cliniche all'interno di ogni capannone si protrassero per circa una decina di giorni, ma il focolaio si estinse solo dopo oltre un mese di malattia, con un andamento e una diffusione della patologia di tipo influenzale tipica per allevamenti di dimensioni simili e già descritta in letteratura (Bardini *et al.,* 2011; Allerson *et al.,* 2011). Nel corso del focolaio di SI fu accertata la morte per malattia respiratoria di n° 66 suini.
I suini colpiti dalla patologia respiratoria furono anche sottoposti a terapia antibiotica per via orale per periodi variabili dai 5 ai 7 giorni continuativi e con i seguenti principi attivi:

Amoxicillina, Doxiciclina, Lincomicina, associazione Sulfamidico-Trimethoprim.
I veterinari aziendali già da alcuni mesi utilizzavano, a scopo diagnostico, in casi di sospetto clinico di SI, il Merial® Flu Kit con buoni risultati e con la convinzione, maturata in questa vasta esperienza d'uso, della necessità di intervenire con questo kit tempestivamente, per non far perdere sensibilità all'esame stesso e comprometterne la validità della risposta (problema dei "falsi-negativi") per la presenza di scarse quantità di virus influenzale nelle cavità nasali, data la breve durata del periodo d'emissione virale (Olsen *et al*.,2006).
In data 23-03-11 furono eseguiti, in suini con peso vivo elevato e con temperatura febbrile, n° 6 tamponi nasali da esaminare col kit rapido e contestualmente ,sugli stessi suini, altri n° 6 tamponi nasali classici (Virocult©), poi inviati tempestivamente al laboratorio (IZSLER PR) per le indagini ulteriori. La lettura degli esiti dell'esame eseguito in allevamento, subito dopo l'esecuzione del test rapido sui tamponi nasali, fu la seguente: 5 tamponi su 6 positivi al virus influenzale di tipo "A".
In data 20-04-11, circa un mese dopo l'esecuzione dei tamponi nasali, n° 30 suini furono sottoposti a un prelievo di sangue per rilevare la presenza di anticorpi contro i più comuni patogeni respiratori del suino da ingrasso e fu eseguita, con gli stessi emosieri, anche un'indagine virologica nei confronti del virus PCV2 (RT-PCR).
In data 16-05-11 furono prelevati n° 20 suini della medesima banda di ingrasso (prelievi traversali) e di nuovo eseguite le analisi di cui sopra ritenute ancora degne di interesse, anche per evidenziare eventuali sieroconversioni.
In data 18-05-11 furono, infine, completate le indagini diagnostiche mediante l'esame al macello delle lesioni Mico-like e delle pleuriti sui polmoni di n° 104 suini; un polmone prelevato al macello nel corso delle osservazioni sopra citate, fu quindi sottoposto a esame anatomopatologico, virologico e batteriologico.
Poiché l'allevatore aveva manifestato una forma clinica simil-influenzale subito dopo il focolaio d'influenza dei suini, lo stesso fu sottoposto a un prelievo di sangue per la ricerca sierologica nei confronti dell'influenza sia suina che umana.

Tabella 1. *Dati zootecnici rilevati nella banda di ingrasso denominata "Ciclo16" colpita da influenza (A/H1N1)*
Table 1. *Fattening batch "Ciclo 16" that experienced Flu outbreak (A/H1N1): zootechnical data*

Parametro	Dato
Data inizio ciclo	29-10-2010
N° capi ad inizio prova	3000
N° capi macellati	2804
Peso vivo medio all'arrivo	32,963
Peso vivo medio al carico per il macello	164,847
Durata media del ciclo in giorni	189
IPMG in grammi	697
Consumo medio di mangime per capo macellato	401
Resa alimentare in % (ICA)*	32,8% (3,04)
N° totale dei morti durante il ciclo e % di mortalità totale	196 (6,76%)
N° suini abbattuti in quanto "scarti" e % /mortalità totale	5 (2,50%)
N° morti per forme respiratorie e %/mortalità totale	**66 (34,90%)**

*Questo dato non tiene conto dell'apporto alimentare fornito dal Siero di latte

Accertamenti diagnostici eseguiti da IZSLER Parma
Tutti i 6 tamponi nasali sono risultati positivi alla prova Real Time PCR per la presenza del gene M del virus dell'influenza suina, la reazione RT-PCR Multiplex per l'identificazione del sottotipo virale ha evidenziato presenza nei campioni n° 1, n° 2, n° 3 di emoagglutinina H1 di tipo umano e neuroaminidasi N1. Nel campione n° 3 è stato possibile evidenziare la contemporanea presenza di emoagglutinina H1 di tipo aviare. Le prove di isolamento virale (VI) hanno permesso di ottenere il virus influenzale suino dai campioni n° 1, n° 2, n° 3, n° 5, n° 6. Le prove di caratterizzazione antigenica tramite IEA (IHA) eseguite su tutti gli isolati hanno rilevato una marcata reattività nei confronti del siero di referenza H1N2 A/sw/Scotland 410440/94, virus capostipite dei virus influenzali suini europei, una più debole reattività nei confronti dei sieri di referenza H1N1 A/sw/It/1513/98, stipite rappresentativo dei virus influenzali suini italiani di tipo aviare. Inoltre gli stipiti isolati hanno reagito anche nei confronti del siero iperimmune H1N1r A/sw/It/7704/01, virus H1N1 isolato nel 2001, riassortante per la presenza di un'emoagglutinina di tipo umano. Le indagini di tipo genetico condotte su HA e NA degli isolati 74528-3 e 74528-5 hanno evidenziato per il gene HA un'omologia del 97% con lo stipite H1N2 A/sw/Kitzen/ IDT6142/07. Per quanto riguarda il gene NA è stata osservata un'omologia del 97% con virus H1N1 A/sw/Spain/53207/2004 rappresentativo degli stipiti H1N1 suini di tipo aviare circolanti in Europa. L'analisi genetica del frammento HA di origine aviare rilevato nel campione n° 3 ha permesso di osservare un'omologia del 97% con virus influenzale suino di tipo aviare H1N1 A/sw/Ghent/132/05.
Gli esiti dell'esame sierologico sul siero dell'allevatore hanno evidenziato presenza d'anticorpi (1/80) nei confronti del virus influenzale v H1N1pandemic 2009, mentre si registrava esito negativo nei confronti del virus H1N1 74528/3 isolato nell'allevamento.

Tabella 2. *Esiti degli esami virologici per influenza effettuati sui 6 tamponi nasali*
Table 2. *Virological test results for influenza virus by n°6 nasal swabs*

Tipo di esame	Tampone n°1	Tampone n°2	Tampone n°3	Tampone n°4	Tampone n°5	Tampone n°6
Test rapido FLU-KIT	**POS**	**POS**	**POS**	NEG	**POS**	**POS**
RT-PCR IZSLER PR	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**
VI-Cult. cell. CACO 2	**POS**	**POS**	**POS**	NEG	NEG	**POS**
VI-Cult. cell. MDCK	**POS**	**POS**	**POS**	NEG	**POS**	**POS**
VI-Uova embrionate	NEG	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**

Tabella 3. *Schema riepilogativo degli esiti degli esami sierologici e virologici effettuati sugli emosieri suini (prelievi trasversali)*
Table 3. *Summary table of serological and virological tests on swine serums (Cross-sectional samples)*

Tipo di esame effettuato	1° PRELIEVO 20-04-11* (n°30) (a distanza di circa sei mesi dall'arrivo in azienda dei suini)	2° PRELIEVO 16-05-11(n°20) (prelievo pre- macellazione)
IHA SIV A/H1N1/267505/10	25/30 negativi 5/30 positivi (titoli tra 1: 20/1:40)	17/20 negativi 3/3 positivi (titoli tra 1:20/1:40)
IHA SIV A/H1N2/284922/09	1/30 negativi 29/30 positivi (titoli tra 1:20 /1:320)	5/20 negativi 15/20 positivi (titoli tra 1:20/1:80)
IHA SIV A/H3N2/312583/09	30/30 negativi	20/20 negativi
PRRS Anticorpi	30/30 negativi	20/20 negativi
Aujeszky anticorpi gE	30/30 negativi	20/20 negativi
PCV2 Anticorpi	30/30 positivi (titoli: tutti = o > 1:10000)	ND
PCV2 RT-PCR	4/30 negativi 26/30 positivi (18/30 con <980 copie di genoma virale/ml; 5/30 con n° copie g.v. comprese tra 1.000 e 12.000/ml)	ND
***Actinobacillus pleuropneumoniae* anticorpi**	23/30 negativi 7/30 positivi	ND
***Mycoplasma hyopneumoniae* anticorpi**	1/30 negativi 29/30 positivi (titoli compresi tra 0,5/3,1 S/P; media titoli S/P: 1,32)	0/20 negativi 20/20 positivi (titoli compresi tra 0,5/2,5 S/P; media titoli S/P: 1,22)

***La diagnosi per Influenza con il kit-rapido fu emessa in data 23-03-11**

Figura 1. *Veduta aerea dell'allevamento da ingrasso (Sito 3) colpito dal focolaio di Influenza*
Figure 1. *Aerial view of fattening herd (Site 3) that experienced Flu outbreak*

Figura 2. *Albero filogenetico delle sequenze della regione HA1 di virus H1N1 e H1N2 di referenza e dello stipiteA/sw/It/74528-5/11*
Figure 2. *Phylogenetic tree of HA1 region of H1N1 and H1N2 reference viruses and of A/sw/It/74528-5/11 strain*

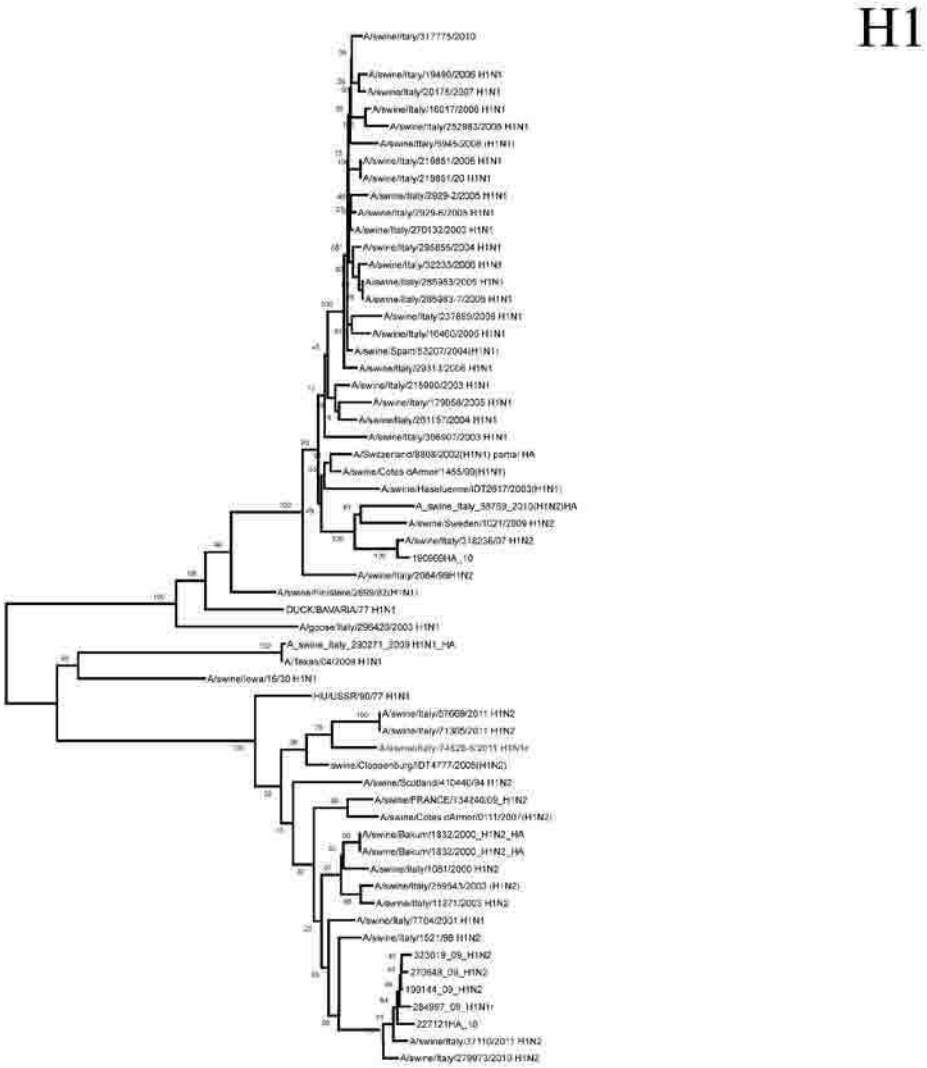
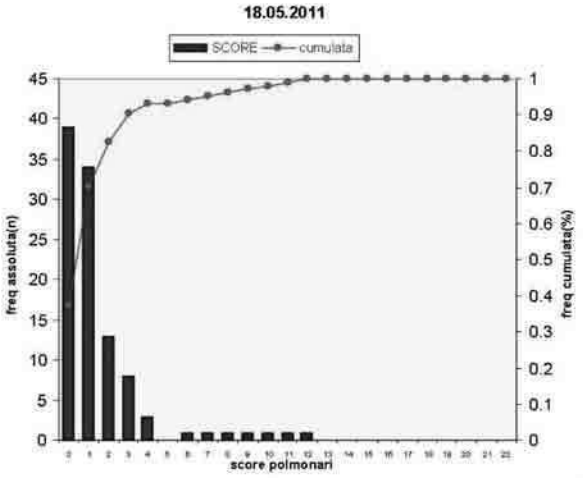


Fig. n.1: Albero filogenetico delle sequenze della regione HA1 di virus H1N1 e H1N2 di referenza e dello stipiteA/sw/It/74528-5/11.

-Macello

Figura 3. *Rappresentazione grafica dei Punteggi polmonari delle lesioni Mico-like*
Figure 3. *Graphic of Myco-like lung lesions score*



Alcuni parametri descrittivi della distribuzione osservata sono qui sotto riportati:

	N	Media	ds	Mediana	Moda	Incidenza
Score polmonare	104	1.53	2.33	1	0	62.5%

Figura 4. *Punteggio A.P.P.I. dell'allevamento esaminato in rapporto alla distribuzione dei punteggi A.P.P.I. nazionali: tali punteggi sono suddivisi in quattro quartili (punteggi medi provenienti dalla classificazione di n° 14.195 polmoni): valori A.P.P.I.<0,28 (quarto migliore delle aziende campionate); valori A.P.P.I. 0,28/0,53 (quarto intermedio migliore); valori A.P.P.I. 0,53/0,81 (quarto intermedio peggiore); valori A.P.P.I.>0,81(quarto peggiore)*

Figure 4. *A.A.P.I. Index of examined fattening herd vs average national A.P.P.I. Index: such values are divided in four classes (Average score based on n° 14.195 lungs observation): A.P.P.I.<0,28 (best quarter); A.P.P.I. from 0,28 to 0,53 (intermediate best quarter); A.P.P.I. from 0,53 to 0,81 (intermediate worst quarter); A.P.P.I. >0,81(worst quarter).*

A.P.P.I. Index = 0,29. Quest'azienda si posiziona nel quarto intermedio migliore della distribuzione delle aziende Italiane finora campionate nel periodo compreso tra febbraio 2008 e gennaio 2011.

-Polmone
L'esame anatomopatologico rilevò la presenza di aree globulari di consolidamento del parenchima polmonare a carattere globulare con localizzazione prevalentemente apicale.
Gli esami virologici tesi a evidenziare, mediante test in PCR, l'eventuale presenza di PRRSv e SIV risultarono negativi.
Fu isolata una *Pasteurella multocida* che l'antibiogramma classificò come sensibile alla maggior parte degli antibiotici-chemioterapici testati.

Impatto economico del focolaio
Per il calcolo, non certamente facile e sempre opinabile, delle perdite subite in seguito a questo prolungato focolaio di SI (A/H1N1), ci siamo avvalsi dell'uso di una tabella che elenca sinteticamente le singole perdite produttive da un lato e il loro impatto economico dall'altro, formulando anche, unicamente per uno degli eventi presi in considerazione, due diverse valutazioni di calcolo.

Tabella 4. *Perdite produttive e relativo impatto economico del focolaio di influenza(A/H1N1)*
Table 4. *Productivity losses caused by the influenza (A/H1N1) outbreak and relative economic impact*

Evento	Valutazione n°1		Valutazione n°2	
	Note e modalità di calcolo	€	Note e modalità di calcolo	€
Terapie	Amoxicillina,Doxiciclina, Lincomicina Sulfamidico/Trimethoprim	+5.300	Idem	+5.300
Suini morti per Influenza(n°66)	66 suini x 145 kg (p.v. medio) x 1,4*€	+13.398	Idem	+13.398
Smaltimento delle carcasse	66 carcasse x 145 kg x 200 €/ ton	+1.914	Idem	+1.914
Mangime non consumato per riduzione consumi	2.804 suini macellati x 1,215 kg**/suino x 10 giorni x 0,17 € ***	-5.791,6	Idem	-5.791,6
Mancato accrescimento dei suini	Questa 1° valutazione è basata sulla riduzione accertata dei consumi di mangime del 45% per 10 giorni: è stimato un decremento conseguente della crescita giornaliera attesa di almeno il 50% = - 3,5 kg p.v. al macello	+13.740	Questa 2° valutazione è basata sulla differenza degli incrementi medi in kg p.v. tra i suini della banda colpita da influenza e la banda precedente dello stesso allevamento non colpita da SI° = - 2,8 kg p.v. al macello	+10.992
Impatto economico totale		28.560,4		25.812,4
Impatto economico calcolato x ogni suino macellato		**10,18**		**9,20**

* Prezzo di mercato di un Kg p.v. di carne suina: a questo andrebbe sommato il premio e il recupero IVA.
**Stimando un normale consumo alimentare giornaliero per un suino di quest'età di 2,7 kg di mangime
***Costo mangime/kg
°Dati non riportati in questo lavoro.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo focolaio conferma l'attualità e l'importanza delle infezioni da SIV nei suini, in quanto le manifestazioni cliniche sono state significative, prolungate ed essendosi estese a tutti i settori di questo allevamento da ingrasso, hanno avuto come conseguenza anche un importante risvolto economico, equiparabile a quelli forniti da altri Autori in altrettanti focolai di SI (Donovan *et al.,* 2005; Bardini *et al.,* 2010; Dréau *et al.,* 2010; Olsen *et al.,*2006). A tal proposito ci sembra corretto segnalare che non è stato possibile rilevare i punteggi qualitativo-merceologici delle carcasse (Griglia EUROP) degli animali coinvolti in questo focolaio e il mancato rilievo non ha consentito di valutare se l'episodio influenzale abbia potuto determinare un peggioramento di tali parametri a forte incidenza economica, come spesso è riportato dai veterinari e allevatori in casi simili. Ci sembra interessante da un lato rilevare che SIV ha svolto in questo focolaio un ruolo come agente eziologico primario di malattia respiratoria, ruolo da tempo riconosciuto a questo virus dalla letteratura (Olsen *et al.,* 2006) e dall'altro, la completa assenza, nei suini coinvolti in questo focolaio, di altre importanti virosi, spesso presenti nei nostri allevamenti, come PRRS e Aujeszky e una situazione sanitaria ben controllata nei confronti di PCV2, come evidenziato dalle indagini sierologiche e virologiche svolte.

Per quello che riguarda il dato dello "*Scoring* polmonare", a fronte di un riscontro pleurico (punteggio S.P.E.S./A.P.P.I.) tranquillizzante (ricordiamo, a tal proposito, che i dati sierologici nei confronti di *Actinobacillus pleuropneumoniae* evidenziarono un basso livello di positività), si può considerare il punteggio medio per le lesioni *Mico-like* (1,53),*pur accettabile, non del tutto soddisfacente: in un gruppo vaccinato per *Mycoplasma hyopneumoniae*, infatti, si può ottenere normalmente di meglio, anche se i fattori che condizionano questo risultato non sono solo di ordine infettivo. Senz'altro il virus influenzale condiziona l'intervento di batteri di irruzione secondaria, soprattutto *Pasteurella multocida*, che notoriamente è l'agente più importante nella complicazione dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dottori M.: **comunicazione personale*).

Un altro rilievo di natura epidemiologica degno di interesse è constatare che tale focolaio di SI si è verificato all'interno di un'organizzazione di allevamento multi-sito, con una gestione dei flussi animali ottimale, che applica con rigore la pratica del "tutto-pieno/tutto-vuoto", in un'area geografica che non è considerata tra quelle a rischio per influenza e in una stagione primaverile ormai mite in quest'area dell'Italia centrale, anche se vicina a un grande lago che potrebbe sempre rappresentare sito di frequentazione di uccelli migratori, potenziali vettori di virus influenzali.

La raccolta dei dati diagnostici ci permette di affermare che nell'allevamento si è verificata un'intensa circolazione di SIV sottotipo H1N1 riassortante per quanto riguarda il gene HA, in quanto riportabile a HA di origine umana, appartenente a SIV sottotipo H1N2: anche i riscontri sierologici per i tre sottotipi di virus influenzali rilevarono indirettamente la presenza di un sottotipo H1N1 "anomalo", in quanto si riscontrarono titoli sierologici elevati per il sottotipo H1N2, nonostante sia poi stato isolato, appunto, un sottotipo H1N1. Inoltre il riscontro, in uno dei campioni, di un frammento di HA riferibile ad un SIV sottotipo H1N1 di tipo aviare, ci autorizza a ipotizzare che si sia verificata la circolazione contemporanea di diversi sottotipi di SIV.

Infine alcune considerazioni sulla diagnosi: le tecniche diagnostiche attualmente a disposizione del veterinario per la conferma di un sospetto, su base clinica, di SI sono diverse, efficaci (VI, RT-PCR, kit rapidi, ecc) e disponibili in molti laboratori diagnostici, ma certamente la raccolta tempestiva di materiale organico da suini con T° in allevamento (la durata dell'emissione virale dalle cavità nasali non sembra andare oltre i 7-8 giorni, come già

ricordato) (Olsen *et al.,* 2006), mediante idonei tamponi nasali, è certamente da privilegiare e incentivare. Le moderne tecniche di analisi genetica, inoltre, possono far luce su molti aspetti di natura epidemiologica relativi a SI ed essere in grado di aiutare il veterinario nell'identificazione dei fattori di rischio e nella conseguente individuazione e applicazione di misure idonee al controllo aziendale di tale malattia dei suini, la cui importanza, nel nostro paese, è spesso sottovalutata.

RINGRAZIAMENTI
Gli autori ringraziano il sig. Paolo Topini, proprietario dell'allevamento e il Dr Giovanni Macris per la preziosa e appassionata collaborazione fornita, nonché la Prof.ssa M.L. Tanzi (Dipartimento di Sanità Pubblica-Università di Parma) per l'esecuzione delle prove sierologiche sul siero umano.

BIBLIOGRAFIA

Allerson M., Torremorell M., Gramer M. (2011) "Duration of influenza virus infection under field conditions in grow-finish swine populations" in Proceedings Allen D.Leman Swine Conference, 71-72.

Bardini R., Leotti G., Nigrelli A.D., Rosignoli C., Foni E., Sarli G., Morandi F., Galuppini A., Zamperlin D..(2011) "Descrizione di un focolaio di Influenza (A/H1N2) in un allevamento a ciclo chiuso" in Atti SIPAS, 234-242.

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". 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases, Roma-29 Giugno/2 Luglio 2003.

Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. (1999) "Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect Mycoplasma hyopneumoniae from nasal swabs". J. Vet. Diagn. Invest. 11 (3):246-251
J Vet Diagn Invest. 1999 May; 11(3):246-51.

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.

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.

Chiapponi C., Barbieri I., Foni E. (2010) "Multiplex RT_PCR for rapid subtyping of hamoagglutinin gene of Italian swine influenza virus" in Proceedings 1st Congress of the European association of veterinary Laboratory Diagnosticians 15-17 September 2010 Lelystad, The Netherlands. P 3-02.

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.

Donovan T. (2005) “The role of Influenza on the growing pig” in Proceedings Allen D. Leman Conference, 97-98.

Dréau D., Perrreul G., Laval A.. (2010) «Primo-infection d’un cheptel de truie par le virus grippal dans une zone de faible densitè porcine en 2010 ». Atti del Congresso AFMVP 2010, Parigi, 104.

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 Meeting annuale SIPAS, 159-166.

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 hypneumoniae”*. Atti XXXV Meeting annuale SIPAS, 229-239.

Guilmoto H. (2003) “La grippe dans l’espece porcine”. Atti del Congresso AFMVP 2003, 5-12.

J.Moody, T.Donovan, (2011) “How we deal with Swine Influenza Virus in a multisite production system” in Proceedings Allen D.Leman Swine Conference, 75-76.

Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004 Jun; 5(2):150-63.

Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M. (2011) “Griglia SPES: aggiornamenti sul monitoraggio delle lesioni pleuriche in suini macellati”. Atti XXXVII Meeting annuale SIPAS, 306-311.

Loeffen W.L.A., Kamp E.M. *et al*.(1999) “Survey of infectious agents involved in acute respiratory diseases in finishing pigs”.Vet.Rec 145,175-180.

Ma W, Lager K.M., Richt J.A., Stoffregen W.C., Zhou F., Yoon K.J. (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.

Madec *et al*., (1992) “Updated according to 2008 economic data”. INRA Prod.Animale, France, 5(2)149-16.

Moreno A., Barbieri I., Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Alborali L., Cordioli P. (2009) “Virus influenzali suini H1N2 in Italia: presenza di ceppi riassorbanti” in Atti XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 25. Parma 30 settembre 2009.

Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., Van Reeth K., (2006) “Swine Influenza”.Diseases of swine,8th edition,469-482.

OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. Office International des Epizooties, Paris.

Ostanello F., Dottori M., Gusmara C, Leotti G., Sala V. (2007) “Pneumonia Disease Assessment using a Slaughterhouse Lung-Score Method”. J.Vet.Med. A54, 70-75.

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” in International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology.

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.

Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K.,

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.

INDAGINE SIEROLOGICA NEI CONFRONTI DEI SOTTOTIPI H1N1, H1N2 E H3N2 DEL VIRUS INFLUENZALE IN CINGHIALI *(SUS SCROFA)* ABBATTUTI IN PROVINCIA DI RIMINI

SEROLOGICAL INVESTIGATION AGAINST H1N1, H1N2 E H3N2 INFLUENZA VIRUS IN WILD BOARS (SUS SCROFA) HUNTED IN THE PROVINCE OF RIMINI, ITALY

FIORENTINI L.[1], TOSI G[1], TADDEI R. [1], ANGELINI R. [2], FABBRI D. [2], MASSI P. [1]

1- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
Sezione Diagnostica di Forlì
2- Azienda Unità Sanitaria Locale di Rimini, Dipartimento di sanità Pubblica,
U.O. Sanità Animale

Parole chiave: influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, sierologia, cinghiale (*Sus scrofa)*
Key words: swine influenza, H1N1, H1N2, H3N2, serology, wild boar (*Sus scrofa)*

Riassunto.
Veniva condotta un'indagine sierologica nei confronti dei virus influenzali suini H1N1, H1N2 and H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL) tramite Inibizione dell'Emoagglutinazione su 307 sieri di cinghiale (*Sus scrofa*) soggetti al Piano di monitoraggio della fauna selvatica 2011, tutti provenienti dalle aree venatorie della Provincia di Rimini. I risultati ottenuti hanno permesso di verificare una sieropositività totale pari al 4,9%: 8 campioni (2.6 %) risultavano positivi al sottotipo H1N1, 2 campioni (0.7 %) risultavano positivi al sottotipo H1N2, 5 campioni (1.6 %) risultavano positivi al sottotipo H3N2. Questa indagine sierologica dimostra la circolazione di tutti i sottotipi indagati dei virus influenzali suini anche nei cinghiali selvatici; la valutazione percentuale dei risultati ha evidenziato una maggior sieroprevalenza per il sottotipo H1N1, più bassi i valori per H3N2 e H1N2. Non sembra condizionante la stagionalità sulla prevalenza dei campioni sieropositivi. La forte presenza di allevamenti suini tipo *outdoor* tipici dell'area di studio, risulta probabilmente un fattore predisponente la circolazione dei virus influenzali tipici dei suidi domestici anche nell'omologo selvatico.

Abstratct.
Sera from 307 wild boars subject to the Plan of wildlife monitoring 2011, were collected in the Province of Rimini, Italy, during hunting season. Inibition of haemoagglutination test was used to detect antibodies against the following swine influenza strains: H1N1, H1N2 and H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL): 4.9% of the total tested samples were positive for antibodies against swine influenza: 8 samples (2.6%) were positive to the H1N1 subtype, 2 samples (0.7%) were positive to the H1N2 subtype, 5 specimens (1.6%) were positive to H3N2 subtype. This serological survey demonstrates the spread of all investigated subtypes of influenza viruses in wild boars. The obtained results showed a highest seroprevalence of the subtype H1N1, the lowest values for H3N2 and H1N2. The presence of *outdoor* pig farms typical of the study area, could be a predisposing factor in the spread of influenza viruses to wild boars.

INTRODUZIONE

Il cinghiale è l'unico animale selvatico italiano appartenente alla famiglia dei suidi, nella quale troviamo anche il suo omologo domestico: il suino.

Entrambi i suidi appartengono al genere *Sus* ed alla specie *Sus scrofa*.

Grazie ad alcune sorprendenti caratteristiche biologiche che lo rendono ecologicamente adattabile quasi a qualsiasi tipo di ambiente, il cinghiale è sicuramente, tra i grandi mammiferi europei, quello che ha conseguito il maggior successo evolutivo.

E' noto che la distribuzione e la consistenza del cinghiale sul territorio nazionale è notevolmente aumentata negli ultimi decenni soprattutto in relazione all'elevato incremento utile annuo tipico di questa specie (il più elevato fra gli ungulati: fino al 180% della popolazione).

Tale fenomeno consegue all'elevata capacità di adattamento, al miglioramento delle condizioni ambientali utili alla specie, alla graduale ricolonizzazione della vegetazione naturale.

L'ecologia quindi la presenza nel territorio delle specie selvatiche è in costante mutamento. I risultati dei recenti censimenti del lupo (unico predatore naturale il cui areale è sovrapposto a quello del cinghiale), hanno evidenziano un aumento di questa specie nell'area di studio, ciò nonostante il cinghiale è ancora molto presente nella provincia di Rimini.

Come molte specie selvatiche, il cinghiale può agire da serbatoio, vettore, ospite occasionale e sistema rivelatore (bioindicatore) di malattie trasmissibili ai suini domestici ad altre specie animali fino all'uomo.

Spesso la selvaggina ungulata e tra questa il cinghiale, si trova in condizioni di convivenza più o meno stretta con l'uomo e con il bestiame domestico. Ciò comporta la necessità di una conoscenza precisa delle interrelazioni di natura epidemiologica che si instaurano fra le popolazioni animali presenti.

Il controllo delle malattie infettive ed infestive nei selvatici è estremamente diverso e mostra maggiori complessità rispetto a quello attuato nei domestici. Per questo è necessario disporre di conoscenze dettagliate sul comportamento e sulla nicchia ecologica di un agente eziologico in un determinato ecosistema e sui rapporti epidemiologici che intercorrono tra agente eziologico e specie animali che possono fungere da ospite.

I selvatici possono presentare problemi sanitari comuni alle specie domestiche e spesso sviluppano una maggiore resistenza alle malattie infettive. Una conseguenza è la condizione di *reservoir* senza evidenza clinica di malattia.

Ciò può costituire un rischio di mantenimento di patologie nell'ambiente, di trasmissione ai selvatici a vita libera, ai domestici allevati fino all'uomo (zoonosi). (Meng X.J., 2009)

Per questo motivo, dal 2006, è in vigore un piano di monitoraggio della fauna selvatica che coinvolge diverse specie animali. A tale piano è affidata un'importante attività di monitoraggio delle malattie trasmissibili all'uomo e non solo, eventualmente presenti in ambito silvetre.

La sorveglianza attiva sui cinghiali prevede attività di campionamento programmata su tutti i capi abbattuti nel corso dell'attività venatoria per la ricerca della Trichinella e, ove possibile, indagini sierologiche per Malattia Vescicolare, Malattia di Aujeszky, Peste Suina Classica, Toxoplasmosi. Il piano prevede inoltre il monitoraggio batteriologico per Tubercolosi e Brucellosi dai campioni prelevati presso i centri di lavorazione della selvaggina cacciata.

Congiuntamente ad accordi presi con il Servizio Veterinario di Rimini, abbiamo ritenuto interessante condurre un'indagine sierologica nei confronti dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2 del virus influenzale, sui cinghiali oggetto di attività venatoria nella stessa provincia. La caccia al cinghiale è praticata in due Ambiti Territoriali di Caccia (ATC) della Provincia di Rimini, il primo comprende l'area della vecchia provincia prima dell'annessione dei Comuni della Valmarecchia, l'altro ricalca i confini dei nuovi Comuni. Ogni ATC ospita al suo interno più distretti di caccia tutti rappresentativi dell'area di campionamento.

Il principale interesse dello studio è legato alla possibilità di poter svolgere un'indagine sierologica su una popolazione di suidi selvatici recettivi ai virus influenzali e senza interferenze vaccinali; di studiare una popolazione di animali che per caratteristiche territoriali hanno elevate probabilità di contatto con il suino domestico. Infatti la provincia di Rimini, soprattutto nella zona collinare, è caratterizzata da un'importante presenza di allevamenti suini all'aperto (*outdoor*) che, se in passato rappresentavano il normale sistema di conduzione oggi, grazie alla diffusione delle produzioni biologiche, sono stati rilanciati come forme di allevamento alternativo.

MATERIALE E METODI

In un periodo compreso tra gennaio e dicembre 2011 venivano analizzati 307 sieri di cinghiale soggetti al Piano di monitoraggio della fauna selvatica 2011-2012, tutti provenienti dalle aree venatorie della Provincia di Rimini (zone basse collinari e collinari, tipicamente preappenniniche con forte prevalenza di macchia mediterranea e faggeta. Il sangue veniva prelevato al momento dell'abbattimento dalla ferita e raccolto in provetta con gel separatore (Venoject). Dopo centrifugazione, il siero ottenuto veniva conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Tutti i sieri sono stati analizzati con test specifici tramite reazione di Inibizione dell'Emoagglutinazione (IEA) (Van Reeth K. et al, 2008) nei confronti dei virus influenzali H1N1, H1N2, H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL). Dopo titolazione dell'antigene tutti i sieri venivano pretrattati con inattivazione termica e potassio periodato allo scopo di eliminare le reazioni crociate con altri antigeni e le reazioni aspecifiche legate alla presenza di proteine sieriche. Venivano considerati positivi i campioni in grado di inibire il 100% di emoagglutinazione (HA) a partire dalla diluizione iniziale 1:20 (OIE-Manual of Diagnostic Tests, ed. 2010)

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica hanno permesso di valutare che 15 campioni su un totale di 307, ovvero il 4,9% dei sieri analizzati, presentavano una risposta sierologica positiva nei confronti di almeno un sottotipo di virus influenzale suino. La tabella 1 riporta i risultati ottenuti. In particolare 8 campioni (pari al 2.6 %) sono risultati positivi al sottotipo H1N1, 2 campioni (pari allo 0.7 %) sono risultati positivi al sottotipo H1N2, 5 campioni (pari allo 1.6 %) sono risultati positivi al sottotipo H3N2. Questa indagine sierologica dimostra la circolazione di tutti i sottotipi indagati dei virus influenzali suini anche nei cinghiali selvatici; la valutazione percentuale dei risultati ha evidenziato nei campioni analizzati una maggior sieroprevalenza per il sottotipo H1N1, più bassi i valori per H3N2 e H1N2.

Non sembra condizionante la stagionalità sulla prevalenza dei campioni sieropositivi. (Tabella 2)

Lo studio conferma l'importanza della sorveglianza epidemiologica della circolazione degli stipiti influenzali anche negli animali selvatici potenziali ospiti recettivi e *reservoir*. (Vicente J. et al, 2002)

CONCLUSIONI

Le infezioni da virus Influenzali (SIV) nel suino domestico sono note da diversi decenni, sono diffuse negli allevamenti suinicoli di tutto il mondo ed occupano un posto di primo piano nella malattia respiratoria del suino.

L'evoluzione subita nel corso del tempo dai virus dell'influenza suina (SIV) ha portato alla circolazione nella popolazione domestica dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2.

Le indagini svolte in precedenza in Italia hanno rivelavano assenza di sieropositività nelle

popolazioni di cinghiali (Cordioli P. et al, 1993), (Ferroglio E. et al, 2003)
Segnalazioni di influenza suina nel cinghiale sono state fatte negli USA (OK) da Saliki *et al* (1998) ed in Spagna da Vicente *et al* (2002) con sieroprevalenze rispettivamente del 4% e dell'11%. Recenti indagini sierologiche condotte su cinghiali italiani, hanno individuato la presenza di anticorpi nei confronti del virus dell'influenza di tipo A nel 34% dei soggetti. (De Marco M.A. et al, 2011)
Dall'indagine sierologica oggetto dello studio, emerge una sieroprevalenza del 4,9% dell'influenza suina nei cinghiali della provincia di Rimini. Anche se bassa, questa sieropositività ai sottotipi influenzali del suino, dimostra una circolazione virale anche in ambito silvestre. Le caratteristiche del territorio, la forte presenza di insediamenti umani in aree sub-urbane, un forte sfruttamento dei terreni a scopi agricoli, ma soprattutto la forte presenza di allevamenti suini tipo *outdoor* tipici dell'area di studio, sono sicuramente fattori che favoriscono la circolazione dei virus influenzali tipici dei suidi domestici anche nell'omologo selvatico che funge così anch'esso da ospite recettivo e *reservoir* .

Tabella 1.
Esiti indagine sierologica nei confronti di virus influenzale suino in 307 sieri di cinghiale tramite IEA

Titolo IEA	**<20**	**20**	**40**	**80**	**160**	**320**	**Totale (%)**
H1N1		6	1	0	1	0	8 (2.6%)
H1N2		0	0	0	2	0	2 (0.7%)
H3N2		3	1	0	0	1	5 (1.6%)
TOTALE CAMPIONI ANALIZZATI n. 307							
TOTALE DI CAMPIONI SIEROPOSITIVI n. 15							
PERCENTUALE DI SIEROPREVALENZA 4.9 %							

Tabella 2.
Rapporto tra campioni sieropositivi e stagionalità

	Totale campioni analizzati	**Totale campioni sieropositivi**	**sieropositivi H1N1**	**sieropositivi H1N2**	**sieropositivi H3N2**
gennaio	0	0	0	0	0
febbraio	0	0	0	0	0
marzo	0	0	0	0	0
aprile	0	0	0	0	0
maggio	**22**	**2**	0	0	**2**
giugno	**8**	0	0	0	0
Luglio	**3**	0	0	0	0
agosto	**6**	**2**	0	0	**2**
settembre	**14**	0	0	0	0
ottobre	**44**	**3**	**2**	0	**1**
novembre	**108**	**6**	**4**	**2**	0
dicembre	**102**	**2**	**2**	0	0

BIBLIOGRAFIA

Cordioli P., Callegari S., Berlinzani A., Foni E., Candotti P. & Barigazzi G. (1993) Indagine sierologica su cinghiali selvatici dell'Appennino parmense. *Atti S.I.S.VET*., XLVII: 1159-1167

De Marco M.A., Cotti C., Ghetti G., Piredda I., Musto C., Raffini E., Frasnelli M., Donatelli I., Delogu M. (2011) Antibodies to influenza A virus in european wild boars (*sus scrofa scrofa*) from northen Italy. 6th European Meeting on Viral Zoonoses, 1-4 October 2011, St Raphaël, France

Ferroglio E., Acutis P.L., Masoero L., Gennero S., Rossi L. (2003) Indagine sierologica su una popolazione di cinghiali nelle alpi Occidentali. J.Mt. Ecol.,7 (Suppl.)

Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. Philosophical transactions of the Royal Society 364, 2697-2707

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. 2010, Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.

Saliki J. T., Rodgers S. J., Eskew G. (1998) Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J. Wildl. Dis.* 34, 834–838

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

Vicente J., León-Vizcaíno L., Gortázar C., José Cubero M., González M., Martín-Atance P. (2002) Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain *J. Wildl. Dis.* 38, 649–*652*

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. 2010, Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.

VALUTAZIONE DELLA CIRCOLAZIONE DI PORCINE BOCAVIRUS-LIKE VIRUS (PBO-LIKEV) IN ALLEVAMENTI SUINI IN NORD ITALIA

EVALUATION OF THE CIRCULATION OF PORCINE BOCAVIRUS-LIKE VIRUS (PBO-LIKEV) IN PIG FARMS IN NORTHERN ITALY

CANELLI E., BRESAOLA M., LAVAZZA A., GIACOMINI E., SOZZI E., LELLI D., FONTANA R., MORENO A., CORDIOLI P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER, sede di Brescia

Parole chiave: Bocavirus, swine, real time PCR
Keywords: Bocavirus, swine, real time PCR

Riassunto
I Bocavirus sono agenti patogeni emergenti e sono stati descritti in associazione a sintomi respiratori, gastroenterici e a disturbi riproduttivi. La prima descrizione di bocavirus-like nel suino è stata fatta in Svezia in suini con PMWS [2]. Successivamente in Cina è stata riportata un'elevata prevalenza di PBo-likeV in suinetti in svezzamento con sintomi respiratori [14]. Altri studi hanno quindi descritto diverse specie di PBo-like virus in suini in China e in Irlanda del Nord [3-5,10,11,13,14]. Ciononostante la significatività clinica e patologica di questo virus nel suino non è stata ancora definita. Lo scopo del presente studio è quello di valutare la presenza di PBo-likeV in allevamenti suini del Nord Italia, mediante l'analisi di 444 campioni (feti, visceri, tamponi nasali e bronchiali) di suini conferiti presso l'IZSLER di Brescia nell'arco di circa quattro mesi (settembre 2011-dicembre 2011). Per la ricerca del DNA di PBo-likeV sono stati impiegati primer e sonda specifici per amplificare una porzione del ORF codificante per la NP1, tipica solo del genoma dei Bocavirus, seguendo la metodica descritta da Li et al., 2011 [7].
Dei 444 campioni analizzati 73 campioni (16,4%) sono risultati positivi alla real time PCR per la ricerca di PBo-likeV. In particolare nessuno dei campioni prelevati da feti è risultato positivo, mentre il DNA di PBo-likeV è stato rilevato in 19 dei 168 visceri (11%) e in 54 tamponi (21%). Dei 159 allevamenti analizzati 35 (22%) sono risultati positivi per la ricerca di PBo-likeV. L'indagine condotta sui campioni scelti per il presente studio ha indicato che PBo-likeV circola negli allevamenti suini del Nord Italia e che i suini in svezzamento sono quelli maggiormente sensibili all'infezione.

Abstract
Bocaviruses are emerging pathogens, and they have been described in association with respiratory and gastrointestinal symptoms, and reproductive disorders. The first description of bocavirus-like in pig has been reported in pigs with PMWS in Sweden [2]. Then a high prevalence of PBo-likeV has been described in weaning piglets with respiratory symptoms in China [14] and then a number of studies led to the description of several species of PBo-like viruses in pig in China and in Northern Ireland [3-5,10,11,13,14]. Nevertheless, the clinical and pathological role of this virus in pigs is not definitevely known. The purpose of this study is to assess the presence of PBo-likeV DNA in pig farms in Northern Italy,

analyzing 444 samples from pigs conferred to the IZSLER of Brescia, during the period September 2011-December 2011. For the detection of the DNA of PBo-likeV primers and probe specific for amplifying a portion of the ORF encoding the NP1, typical only of the Bocavirus genome, were used, following the protocol described by Li et al., 2011 [7]. Of the 444 samples analyzed 73 samples (16.4%) were positive in real-time PCR for the detection of PBo-likeV. In particular none of the samples obtained from fetuses were positive, while the DNA of PBo-likeV was detected in 19 of 168 viscera (11%) and in 54 swabs (21%). Of the 159 analyzed farms, 35 (22%) were positive for the detection of PBo-likeV. The survey conducted on the samples chosen for this study indicated that PBo-likeV circulates in swine herds in Northern Italy and that weaning pigs are most susceptible to infection.

INTRODUZIONE

I Parvovirus sono patogeni molto diffusi e responsabili di varie patologie negli animali. La famiglia Parvoviridae è suddivisa in due sottofamiglie, Parvovirinae, i cui membri infettano i vertebrati, e Densovirinae, i cui membri infettano gli artropodi. Il genere Bocavirus, appartenente alla famiglia Parvovirinae, è attualmente composto da vari membri: bocavirus bovino (BPV), canine minute virus (CnMV), bocavirus del gorilla (GBoV), bocavirus dello chimpanzee (ChBoV), quattro specie di bocavirus umano (HBoV) e varie specie di bocavirus suino (PBoV/PBo-likeV). HBoV è il Bocavirus più studiato, in quanto agente eziologico di patologie respiratorie nei bambini [8]. Bocavirus è un virus piccolo, privo di envelope, a DNA a singolo filamento, con capside icosaedrico. Il genoma è di 5.4 kb circa e la particolarità unica di questo genere consiste nell'avere un extra ORF che codifica per una proteina non strutturale altamente fosforilata (NP1) [9]. Il nome Bocavirus deriva dagli iniziali due componenti del genere: BPV e CnMN. I Bocavirus sono agenti patogeni emergenti e sono stati descritti in associazione a sintomi respiratori, gastroenterici e a disturbi riproduttivi [9]. Le manifestazioni cliniche della malattia vengono solitamente osservate nei giovani, mentre negli adulti l'infezione è per lo più asintomatica. La prima descrizione di un parvovirus bocavirus-like nel suino è stata fatta in Svezia a partire da linfonodi di suini con PMWS (PBoV/PBo-likeV) [2]. Successivamente, un'elevata prevalenza (38,7%) di PBo-likeV è stata descritta in suinetti in svezzamento con sintomi respiratori in Cina [14]. In seguito il virus è stato rilevato in suini con e senza PMWS, con tassi di infezione del 88% e 46% rispettivamente [1], ed anche in animali sani [14]. Sono poi state descritte in Cina almeno altre 4 specie (PBoV1, PBoV2, PBoV ceppo 6V e ceppo 7V) [3-5, 12, 13] e ulteriori due, definite come PBoV3 e PBoV4, sono state isolate da suini di allevamenti in Irlanda del Nord e in associazione a polmonite e gravi manifestazioni diarroiche e a PMWS [10, 11]. Ciononostante la significatività clinica e patologica di questo virus nel suino non è stata ancora definitivamente accertata.

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la presenza e quindi la circolazione di PBo-likeV in allevamenti suini del Nord Italia, tenendo conto delle differenti situazioni cliniche/patologiche/epidemiologiche al fine di valutare l'associazione del virus con particolari classi di età, sintomatologie o matrici campionate.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati utilizzati 444 campioni di suini conferiti presso la sezione diagnostica o il reparto di virologia dell'IZSLER di Brescia nell'arco di circa quattro mesi (settembre 2011-dicembre 2011). La scelta dei campioni da esaminare è stata eseguita tenendo conto delle diverse localizzazioni dei Bocavirus, ma anche con lo scopo di valutare le classi di età

maggiormente coinvolte e la presenza del virus in situazioni cliniche ed epidemiologiche differenti. Gli allevamenti di suini (n = 159) dai quali provenivano i materiali patologici per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola (Lombardia – Veneto – Piemonte – Emilia Romagna). In totale sono stati analizzati 444 campioni, dei quali 25 feti, 168 visceri (pool di visceri contenenti almeno i polmoni) e 251 tamponi (55 bronchiali e 196 nasali). Una parte degli animali campionati (n=201) è stata conferita al laboratorio per le analisi di routine in seguito a sintomatologie o lesioni differenti: feti abortiti (25/444), sintomi respiratori (99/444), gastro-enterici (33/444) e dimagrimento (5/444), lesioni varie (cistiti, ulcere, rotture epatiche, degenerazioni miocardiche, linfoadenomegalie, polisierositi ecc.) (15/444); a volte anche presenti contemporaneamente sullo stesso animale (24/444 casi). Tutti gli altri campioni (n=243), corrispondono a prelievi (tamponi nasali o bronchiali) fatti per altri scopi di ricerca in allevamenti suini su animali a differenti classi di età (solitamente dai suinetti sottoscrofa fino allo svezzamento e quando presenti anche sui suini in magronaggio-ingrasso), senza tener conto dell'eventuale presenza di sintomatologie a livello di singolo animale o di allevamento. In generale i campioni scelti sono risultati rappresentativi delle diverse classi d'età comprendendo: feti (25/444), sottoscrofa, fino a 3 settimane d'età (44/444), svezzamento, da 4 a 12 settimane d'età (218/444), magroni-ingrassi, da 13 settimane d'età (152/444), riproduttori, scrofe (5/444).

Real time PCR

Gli acidi nucleici virali sono stati estratti partendo da 100µl di surnatante dell'omogenato di tessuto (1:10 in MEM-A) o del tampone nasale (mantenuto in circa 1 ml di PBS), mediante l'utilizzo del kit *BioSprint 96 One-For-All Vet Kit*® (Qiagen) in un sistema di estrazione semiautomatico *KingFisher*® *96* (TermoLabs system). Per la ricerca del DNA di PBo-likeV sono stati impiegati primer e sonda specifici per amplificare una porzione della NP1, seguendo la metodica descritta da Li et al., 2011 [7]. Il gene NP1 è altamente conservato nei Bocavirus, e per questo motivo è stato scelto come target per la ricerca del genoma virale. Le sequenze e la posizione di primer e sonda sono riportate nella tabella. La real-time PCR è stata eseguita in una reazione di 20 microlitri contenente 2 microlitri di DNA estratto, 500 nM di ciascun primer e 250 nM di sonda. L'amplificazione, il rilevamento e l'analisi delle curve sono state effettuate sullo strumento Step One Plus (Applied Biosystems), con le seguenti condizioni: 50 ° C per 2 minuti, 95 ° C per 10 minuti e 45 cicli di amplificazione (15 s a 95 ° C e 1 minuto a 60 ° C). Sono stati considerati positivi i campioni che avevano un ct (*threshold cycle)* pari o inferiore a 37.

Tab. 1 Primer e sonda impiegati nella real time PCR per PBo-likeV. La posizione nucleotidica riportata è da considerarsi rispetto al gene NP1 del ceppo PBo-likeV JSNJ1 (GenBank acc. no. HQ872052)

Gene/Primer	*Sequenza (5'-3')*	*Posizione*
NP1/ Forward	TCGAGCTATACAACCGAAGAAGAGA	37-61
NP1/ Reverse	TGTTTCGGAGATGTCCTTGCT	93-113
NP1/sonda	FAM-5'-CAGCTCTTCGAATCGCCGCTCTCC-3'-TAMRA	63-86

RISULTATI

Dei 444 campioni analizzati 73 campioni (16,4%) sono risultati positivi alla real time PCR per la ricerca di PBo-likeV. In particolare nessuno dei campioni ottenuti da feti è risultato positivo, mentre il DNA di PBo-likeV è stato rilevato in 19 dei 168 visceri (11%) e in 54 tamponi (21%) (Tab. 2). Dei 159 allevamenti analizzati 35 (22%) sono risultati positivi per la ricerca di PBo-likeV.

Tab. 2 Campioni analizzati e positività per PBo-likeV suddivisi per matrice (tamponi, visceri, feti).

Matrice	*Tamponi*		*Visceri*	*Feti*	*Totale*
	nasali	*bronchiali*			
Campioni analizzati	196	55	168	25	444
Positivi PBo-likeV	39 (20,0%)	15 (27,0%)	19 (11,0%)	0	73 (16,4%)

Considerando le classi d'età, nessuno dei riproduttori e dei feti è risultato positivo, mentre le percentuali di positività per sottoscrofa, svezzamento e magronaggio-ingrasso sono state del 4%, 25% e 11%, rispettivamente (Tab. 3).

Tab. 3 Campioni analizzati, positività per PBo-likeV e ct in real time PCR suddivisi per classi di età: feto, sottoscrofa (fino a 3 settimane), svezzamento (da 4 settimane a 12 settimane), magroni-ingrassi (da 13 settimane), riproduttori.

Fasce di età	*Feti*	*Sottoscrofa*	*Svezzamento*	*Magroni-Ingrassi*	*Riproduttori*	*Totale*
Campioni analizzati	25	44	218	152	5	444
Positivi PBo-likeV	0	2 (4%)	54 (25%)	17 (11%)	0	73
ct medio (range)	-	35 (34,8-35,5)	29,7 (22,4-37,1)	30 (24,3-37,0)	-	-

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'indagine condotta sui campioni scelti per il presente studio ha indicato che PBo-likeV circola negli allevamenti suini del Nord Italia, infatti una percentuale del 22% degli allevamenti analizzati è risultata positiva in real time PCR, con una maggiore prevalenza nei suini in svezzamento (25%), rispetto ai sottoscrofa (4%) e al settore magronaggio/ingrasso (11%). Questi risultati, insieme al mancato rilevamento del virus in feti abortiti e nei riproduttori, confermano quanto osservato da altri Autori, che descrivono la maggior sensibilità dei suini durante il periodo di svezzamento [10, 14].

Non è stato possibile stabilire un'associazione esatta tra sintomatologia e presenza del virus, in quanto l'anamnesi era presente in meno della metà dei casi (n=201). Ciononostante tutti i campioni per i quali non era riportata erano tamponi nasali o bronchiali. Di questi il 25% è risultato positivo, confermando un forte tropismo del virus per l'apparato respiratorio e indicando il tampone nasale o bronchiale come matrice d'elezione per il rilevamento del

virus. Lau et al., 2011 riportano un ampio tropismo cellulare del virus, suggerendo come possibile campione anche le feci [6]. Nella nostra indagine la presenza del DNA virale è stata riscontrata nel 13% dei soggetti con sintomi o lesioni gastro-enteriche, da sole o in associazione a sintomi o lesioni respiratorie, evidenziando il tropismo gastroenterico già descritto per questo virus [10]. Per nessuno dei suini analizzati era stata specificatamente riportata la diagnosi di PMWS o PCVAD e non è quindi possibile fare associazioni tra la prevalenza riscontrata e queste sindromi. Ciononostante, proprio per questo motivo è possibile ipotizzare che la prevalenza del 16% riscontrata in questo studio, più bassa di quelle riportate in altri paesi (vicine al 40%), possa essere dovuta al non aver esaminato suini per i quali la diagnosi o l'anamnesi era di PMWS o PCVAD.
La real time PCR utilizzata, costruita su un target specifico per i Bocavirus (NP1), si è dimostrata utile e sensibile per lo screening di campioni di suino per PBo-likeV.
Ad oggi la significatività clinica e patologica dei ceppi suini non è ancora stata ben chiarita. Ciononostante le iniziali associazioni di PBo-likeV a PMWS e sintomatologia respiratoria rimangono significative. In particolare il fatto di aver individuato un ulteriore virus associato a PMWS è interessante in quanto sono ancora molte le lacune e le domande aperte riguardanti l'eziologia di questa sindrome. Inoltre l'identificazione del Bocavirus in suini allo svezzamento con patologia respiratoria lo indica come possibile patogeno respiratorio emergente.
Il presente lavoro si pone come valutazione preliminare della presenza e della circolazione del virus negli allevamenti suini italiani e rappresenta la base per ulteriori studi, legati soprattutto alla patogenicità del virus come agente eziologico primario o come co-agente di infezione.

BIBLIOGRAFIA

Blomstrom A. L., Belak S., Fossum C., Fuxler L., Wallgren P., Berg M. (2010), "Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like viruses and torque teno viruses indicated the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs". Virus Res, 152, 59-64

Blomstrom A. L., Belak S., Fossum C., McKillen J., Allan G., Wallgren P., Berg M. (2009), "Detection of a novel porcine boca-like viruses in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome". Virus Res, 146:125-129

Cheng W.X., Li J.S., Huang C.P., Yao D.P., Liu W., Cui S.X., Jin Y., Duan Z.J. (2010), "Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses". PLoS ONE, 5 (10): e13583

Cheung A.K., Wu G., Wang D., Bayles D.O., Lager K.M., Vincent A.L. (2010), "Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus". Arch Virol, 155:801-806

Lau S.K., Woo P.C., Tse H., Fu C.T., Au W.K., Chen X.C., Tsoi H.W., Tsang T.H., Chan J.S., et al. (2008), "Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4". J Virol, 89:1840-1848

Lau S.K., Woo P.C., Yip C.C, Li K. S. M., Fu C. T, Huang Y, Chan K-H., Yuen K-Y. (in press), "Co-existence of multiple starins of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in Parvoviridae and evidence for inter- and intra- host genetic diversity and recombination". JGv in press, june 2011

Li B., Xiao S., Ma J., Liu Y., Mao L., Wen L., et al.: (2011), "Development of a novel TaqMan-based Real-time PCR assay for the detection of porcine boca-like viruses (PBo-likeV)". Virol J 8:357-361

Lu X.Y., Malinee O.C., Mackay I.M., Sloots T.P., Fry A.M., Erdman D.D. (2006), "Real-Time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens". J Clin Microbiol, 44:3231-3235
Manteufel J., Truyen U. (2008), "Animal bocaviruses: a brief review". Intervirology, 51:328-334
McKillen J., McNeilly F., Duffy C., McMenamy M., McNair I., Hjertner B., Millar A., McKay K., Lagan P., Adair B., Allan G. (2011), "Isolation in cell culture and initial characterization of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland". Vet Microbiol 152(1–2):39–45
McNair I., McNeilly F., Duffy C., McMenamy M., Welsh M., Allan G. (2011), "Production, characterization and application of monoclonal antibodies to two novel porcine bocaviruses from swine in Northern Ireland". Arch Virol
Shan T., Lan D., Li L., Wang C., Cui L., Zhang W., Hua X., Zhu C., Zhao W., Delwart E. (2011), "Genomic characterization and high prevalence of bocaviruses in swine". PLoS ONE, 6 (4): e17292
Zeng S.L., Wang D., Fang L.R., Ma J., Song T., Zhang X.R., Chen H.C., Xiao S.B. (2011), "Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus (PBoV)". J Virol, 92:784-788
Zhai S.L., Yue C., Wei Z.Z., Long J.X., Ran D.L., Lin T., Deng Y., Huang L., Sun L.C., et al (2010) "High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract Symptoms in China". Arch Virol, 155:1313-1317.

ASTROVIRUS: POSSIBILE IMPLICAZIONE NELL'EZIOLOGIA DI ENTERITE NEL SUINO

ASTROVIRUSES: POSSIBLE IMPLICATION IN SWINE ENTERITIS ETIOLOGY

CANELLI E., LAVAZZA A., BRESAOLA M., BARBIERI I., SOZZI E., LELLI D., FONTANA R., MORENO A., CORDIOLI P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER, sede di Brescia

Parole chiave: Astrovirus, enterite, suino
Keywords: Astrovirus, enteritis, swine

Riassunto
Gli Astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope a singolo filamento di RNA. L'Astrovirus suino (porcine Astrovirus, pAstV) è stato descritto per la prima volta utilizzando la microscopia elettronica (ME) nel 1980 in feci di suinetti diarroici [1]. I dati riguardanti la distribuzione, l'epidemiologia e la significatività degli Astrovirus nel suino sono ancora limitati. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di analizzare mediante RT-PCR per la presenza di pAstV, campioni di suini con enterite o diarrea, per i quali la diagnosi in microscopia elettronica era di presenza di particelle enterovirus-like (EVL). Sono stati analizzati 18 campioni di feci e contenuti intestinali, di questi sono risultati positivi per pAstV 10 campioni, sette dei quali sono stati poi sequenziati e analizzati filogeneticamente. I risultati ottenuti indicano che pAstV è presente negli allevamenti suini in Italia e lasciano ipotizzare un possibile coinvolgimento eziopatogenetico nelle enteriti che caratterizzano i suini alle età critiche.

Abstract
The Astrovirus (AstV) are small non-enveloped viruses with single-stranded RNA. The porcine Astrovirus (pAstV) has been described for the first time by electron microscopy (EM) in 1980 in faeces of diarrheic piglets [1]. Data on the distribution, epidemiology and significance of Astrovirus in swine are still limited. The purpose of this work was therefore to analyze by RT-PCR for the presence of pAstV samples (faeces and intestinal contents) of pigs with enteritis, for which the diagnosis by negative staining electron microscopy was of presence of enterovirus-like particles. Eighteen samples were analyzed, 10 of these samples were positive for pAstV, and seven of them were then sequenced and phylogenetically analyzed. The obtained results indicate the presence of pAstV even in Italian pig farms and fortify the hypothesis of an aetiopathogenetical involvement in enteritis of pig at critical ages.

INTRODUZIONE

Gli Astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope a singolo filamento di RNA, di dimensioni variabili tra 6.4 e 7.3kb. Appartengono alla famiglia Astroviridae, che comprende due generi, Avastrovirus e Mamastrovirus, i cui membri infettano rispettivamente le specie aviari e i mammiferi. Gli Astrovirus umani sono un'importante causa, seconda solo ai Rotavirus, di gastroenterite con ospedalizzazione nei bambini. In generale i Mamastrovirus sono virus rilevati in diverse specie (uomo, pecora, suino, cane, gatto, coniglio, mammiferi marini ecc.) in associazione a enterite [9], per quanto riguarda i ceppi aviari sono stati invece collegati a

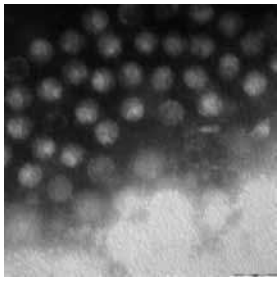
manifestazioni cliniche intestinali ma anche extraintestinali [4; 10]. Zhu et al., 2009 indicano la presenza di 7 gruppi genetici, dei quali il gruppo 1 contiene ceppi umani, suini e felini, i gruppi 2, 5, 6 e 7 solo ceppi isolati da pipistrelli e il gruppo 3 e 4 ceppi ovini, di visone e di pipistrelli [15]. Il genoma di Astrovirus presenta tre open reading frames (ORF). ORF1a codifica per la poliproteina non strutturale 1a, mentre la ORF1b codifica per la poliproteina 1ab, la quale contiene una RNA polimerasi RNA-dipendente (RDRP) che si esprime attraverso un frameshift ribosomiale a livello della giunzione ORF1a/1b. Infine ORF2 codifica per la poliproteina strutturale del capside virale [10].
Astrovirus suino (porcine Astrovirus, pAstV) è stato descritto per la prima volta in microscopia elettronica (ME) nel 1980 in feci di suinetti diarroici [1] ed è poi stato isolato su colture cellulari [3, 13]. Recentemente alcuni lavori hanno descritto sia la variabilità genetica dei ceppi di pAstV, sia alcuni eventi di ricombinazione e hanno anche dimostrato il ruolo del suino nell'ecologia e nell'evoluzione del virus [5; 9; 12; 14]. PAstV è stato spesso riportato in associazione a gastroenterite [1; 13; 3], e la malattia è stata riprodotta anche in condizioni sperimentali [3; 13]. Ciononostante Luo et al., 2011 hanno rilevato la presenza di Astrovirus anche in suini sani [9]. I dati riguardanti la distribuzione, l'epidemiologia e la significatività degli Astrovirus nel suino rimangono ad oggi limitati.
Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la presenza di pAstV in campioni (feci e contenuti intestinali) di suini con enterite o diarrea, risultati positivi in microscopia elettronica per la presenza di particelle enterovirus-like (ELV) e successivamente di caratterizzare gli eventuali stipiti rilevati dal punto di vista genetico.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati analizzati 18 campioni di contenuti intestinali o feci di suini conferiti al laboratorio di Microscopia Elettronica dell'IZSLER tra il 2008 e il 2011. Gli allevamenti di suini dai quali proveniva il materiale patologico per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola (Lombardia, Emilia Romagna, Veneto). Gli animali prelevati presentavano forme cliniche riferibili ad enterite o gastroenterite e diarrea. L'età e le altre informazioni riguardanti i campioni sono riportate nella tabella 1. I campioni sono stati scelti poiché all'osservazione in ME in colorazione negativa (nsME), previa ultracentrifugazione con Airfuge Backman [7] sono risultati positivi per particelle EVL. Queste particelle sono morfologicamente e di dimensioni paragonabili a quelle degli Astrovirus, e non è possibile differenziarle tra loro utilizzando solo la ME (Fig.1). I campioni erano già stati analizzati in routine per i principali patogeni enterici del suino, come riportato in Tab. 1.

Figura 1. Particelle virali morfologicamente riferibili a enterovirus-like. Colorazione negativa NaPt 2%. Bar = 100 nm



RT-PCR

Gli acidi nucleici virali presenti nei campioni sono stati estratti utilizzando QIAmp MinElute Virus Spin (Qiagen) e successivamente analizzati mediante RT-PCR [12] per la ricerca del RNA di pAstV. Per la reazione sono stati utilizzati primer specifici (pAstV-F, 5'-TGACATTTTGTGGATTTACAGTT e pAstV-R, 5'-CACCCAGGGCTGACCA) che amplificano una regione di 799nt delle ORF1b e 2. Le reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione sono state condotte insieme in un sistema one step-RT-PCR utilizzando il kit one step-RT-PCR (Qiagen). Il profilo termico prevede 30' a 50°C ,15' a 94°C e 40 cicli di 30" a 95°C, 45" a 55°C e 45" a 72 °C, con un'elongazione finale di 7' a 72°C. I prodotti della reazione di RT-PCR sono poi stati analizzati su gel di agarosio all'1.5% per valutare la presenza di bande del peso atteso (799bp).

Sequenziamento e analisi filogenetica

Per confermare il risultato ottenuto e avere maggiori informazioni sui campioni positivi, gli amplificati positivi alla RT-PCR sono stati sequenziati, dopo purificazione utilizzando BigDye terminator kit (Applied Biosystems) con gli stessi primers della RT-PCR, in entrambe le direzioni con sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), e analizzati filogeneticamente utilizzando BLAST. L'allineamento delle sequenze è stato calcolato utilizzando CLUSTAL W (software Lasergene-DNASTAR Inc.) e l'analisi filogenetica è stata costruita utilizzando PAUP (software MEGA version 5.0). Le sequenze dei campioni analizzati sono poi state confrontate con quelle dei ceppi riportati in altre pubblicazioni [6,9,12] e presenti in Gen Bank. L'albero è stato costruito utilizzando Neighbor-joining con 1000 Bootstrap Replications e il Kimura 2-parameter model.

RISULTATI

RT-PCR

Dieci dei 18 campioni analizzati sono risultati positivi alla RT-PCR per pAstV (Tab.1).

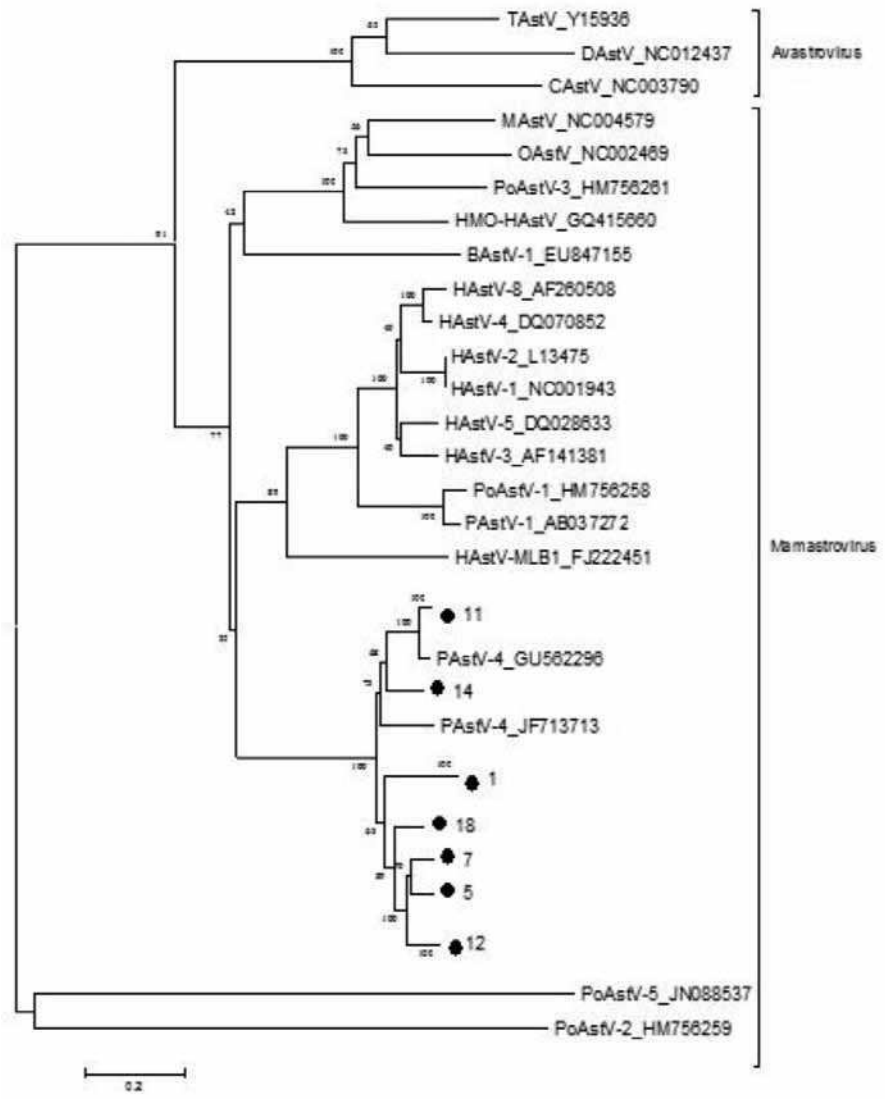
Tabella 1. Campioni analizzati suddivisi per anno, numero progressivo, provincia, materiale, età dell'animale, risultati dei vari esami precedentemente condotti sul campione (esame anatomo-patologico, batteriologico per *Salmonella*, ELISA virologico per Coronavirus della PED, ELISA/nsME per Rotavirus, RT_PCR per Enterovirus suini (Teschovirus/PEV-A/PEV-B) ed esito RT-PCR per pAstV. (legenda: n.r.: non riportato)

Anno	N. progr.	Prov	Materiale	Età	Anatomopat.	*Salmonella*	PEDV	Rotavirus	Enterovirus	pAstV
2008	1	TV	cont.intest.	svezzamento	enterocolite	neg	neg	neg	pos	pos
2009	2	VR	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	pos	neg	neg
	3	BS	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	4	CR	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	5	BS	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
2010	6	BS	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	7	BS	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	8	VR	feci	magrone	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	9	MI	cont.intest.	svezzamento	enterite	neg	neg	neg	pos	neg
	10	CR	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	pos	neg	pos
2011	11	CR	feci	n.r.	diarrea	pos	neg	pos	pos	pos
	12	BS	feci	n.r.	diarrea	pos	neg	pos	neg	pos
	13	BS	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	14	MN	feci	n.r.	diarrea	pos	neg	neg	neg	pos
	15	PC	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	neg
	16	PC	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	neg
	17	PC	feci	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	pos	neg
	18	BS	cont.intest.	svezzamento	enterocolite	neg	neg	neg	pos	pos

Sequenziamento e analisi filogenetica

Una sequenza è stata ottenuta solo per 7 (n=1-5-7-11-12-14-18) dei 10 campioni positivi, mentre per tre campioni (n=8-10-13) la sequenza è risultata mista. L'analisi in BLAST delle sequenze dei sette campioni ha confermato l'identità con pAStV. Nell'albero filogenetico (Fig.2) sono stati inseriti i ceppi rappresentativi degli Astrovirus e le sequenze di ceppi ottenute in questo studio. I ceppi analizzati si sono disposti nel cluster dei ceppi usati come riferimento per il PAstV-4.

Figura 2. Albero filogenetico ottenuto dall'analisi di 799bp della regione ORF1b/ORF2 dei ceppi analizzati. I ceppi analizzati sono contrassegnati da un pallino nero, mentre i ceppi usati come riferimento riportano a fianco i rispettivi numeri di accesso Gen Bank.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati preliminari ottenuti da questo studio confermano l'identificazione di pAstV nel contenuto intestinale e nelle feci di suini conferiti al laboratorio a seguito di una diagnosi clinica o anatomo-patologica di diarrea o enterite/gastroenterite e indicano quindi la presenza di questo virus anche negli allevamenti suini in Italia.

In 4 campioni sono stati riscontrati come unico agente infettivo coinvolto, in altri 2 casi in associazione a Enterovirus , in 1 caso a *Salmonella* e in 3 casi in associazione a Rotavirus. Questi risultati rendono plausibile una possibile correlazione eziopatogenetica di pAstV con quadri di enterite/diarrea nel suino. Ciononostante il loro ruolo definitivo sia come agente primario che come co-patogeno nella patogenesi di enterite deve essere meglio chiarito.

La nsEM si è confermata come un metodo di scelta per uno screening iniziale di enterite virale, poiché è veloce, totipotente (*catch-all-method*), in grado di identificare virus che non possono essere isolati o identificati con altri metodi ed è anche in grado di mostrare infezioni miste, tuttavia non consente ulteriori discriminazioni e caratterizzazioni di virus morfologicamente simili tra loro, fatto questo che impone l'uso di PCR, in combinazione o meno con il sequenziamento dei prodotti. Quindi, in associazione alla nsME o come metodica specifica per la ricerca diretta di pAstV nei campioni fecali, la RT_PCR si è dimostrata sensibile e adeguata. L'albero filogenetico (Fig.2) contiene i diversi gruppi dei Mamastrovirus e Avastrovirus. L'analisi filogenetica fatta sulla regione ORF 1b e ORF 2 dimostra che i ceppi analizzati di pAstV si dispongono in diversi rami di un unico cluster all'interno dell'albero Mamastrovirus ed in particolare insieme ai ceppi del pAstV4. I nostri risultati preliminari confermano quindi una certa variabilità genetica dei ceppi di pAstV anche se non paragonabile a quella descritta dai vari gruppi che negli ultimi anni hanno studiato le caratteristiche genetiche di pAstV [3; 9; 12]. In generale la variabilità genetica degli AstV suggerisce diverse origini dei diversi lineaggi e presume che esistano eventi di ricombinazione e trasmissione interspecifica tra diverse specie di ospiti mammiferi [4; 9]. Ulloa et al., 2010 hanno mostrato correlazioni genetiche tra Astrovirus del suino ed umani, ipotizzando una possibile ricombinazione interspecifica degli Astrovirus di queste specie [14]. La ricombinazione è un fenomeno frequente e comune nei virus a RNA a senso positivo, quindi risulta possibile anche per gli AstV. Nell'uomo si conoscono lineaggi geneticamente differenti di HAstV (HAstV classici, HAstV-MLB e HMOAstV) [2] e i ceppi di pAstV sono associati non solo al ceppo prototipo dell'Astrovirus umano, ma anche a ceppi umani scoperti recentemente, sottolineando che eventi di trasmissioni interspecifiche multiple tra questo ospite e altre specie sono possibili [9].

Le infezioni sperimentali condotte da Bridger, 1980 e Shimizu et al., 1990 hanno dimostrato la patogenicità di pAstV nel suinetto, ma non ne provano il ruolo definitivo come agente primario di enterite. Nonostante ciò, va ricordato che anche lievi diarree o enteriti inducono gravi perdite nell'allevamento suino andando ad aumentare gli scarti, le disparità nella nidiata e i costi per il diminuito incremento e le spese mediche e diagnostiche. In realtà la compartecipazione/associazione con altri agenti patogeni che agiscono allo stesso livello e in soggetti della stessa età (ad esempio i campioni risultati positivi anche per Enterovirus e Rotavirus), l'induzione di sintomi enterici anche lievi o di manifestazioni più gravi negli animali giovani sono state osservate per gli Astrovirus in tutte le altre specie e quindi possono essere espressione della patogenicità anche di pAstV nel suino.

I patogeni emergenti rappresentano un costante rischio per la sanità animale e umana. I suini sono sempre più identificati come portatori di un ampio range di virus che sembrano stabilire una persistenza a lungo termine in questa specie, e inoltre appaiono spesso come reservoir per molti agenti zoonosici [5]. Di conseguenza dovrebbe essere implementata una costante

sorveglianza per rilevare ogni nuovo virus identificato nel suino, che deve poi essere studiato e analizzato con attenzione per capirne l'ecologia, la patogenesi e l'epidemiologia.

BIBLIOGRAFIA

Bridger J.C. (1980), "Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhea". Vet Rec 107, 532–533

Finkbeiner S. R., Le B. M., Holtz L. R., Storch G. A. & Wang D. (2009), "Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children". Emerg Infect Dis 15, 441–444

Indik S., Valicek L., Smid B., Dvorakova H., Rodak L. (2006), "Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus". Vet Microbiol 117, 276–283

Jonassen C.M., Jonassen T.O., Saif Y.M., Snodgrass D.R., Ushijima H., Shimizu M., Grinde B. (2001), "Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses". J Gen Virol 82, 1061–1067

Lan D., Ji W., Shan T., Cui L., Yang Z., Yaun C., Hua X. (2011), "Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China". Arch Virol 156, 1869-1875

Laurin M.-A., Dastor M., L'Homme Y. (2011), "Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses". Arch Virol 156, 2095–2099

Lavazza, A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990) Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. Vet Rec, 126, 581.

Lukashov V.V. & Goudsmit J. (2002), "Evolutionary relationships among Astroviridae". J Gen Virol 83, 1397–1405

Luo Z., Roi S., Dastor M., Gallice E., Laurin M.-A., L'homme Y. (2011), "Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs". Vet Microbiol 149, 316–323

Mendez E. & Arias C.F. (2007), "Astroviruses". In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds) "Fields virology". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5th ed., vol. 1, pp 981–1000

Monroe S.S. (2005), "Astroviridae". In: Carter M.J., Herrmann J., Mitchel J.K., Sanchez-Fauquier A. (eds) "Virus taxonomy". Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, pp 859–864

Reuter G., Pankovics P., Boros A. (2011), "Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary". Arch Virol 156, 125–128

Shimizu M., Shirai J., Narita M., Yamane T. (1990), "Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney". J Clin Microbiol 28, 201–20

Ulloha J.C. & Gutierrez M.F. (2010), "Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses". Can J Microbiol 2010 56(7), 569–577

Zhu H. C., Chu D. K., Liu W., Dong B. Q., Zhang S. Y., Zhang J. X., Li L. F., Vijaykrishna D., Smith G. J. & other authors (2009), "Detection of diverse astroviruses from bats in China". J Gen Virol 90, 883–*887.*

POSTER

TIPIZZAZIONE FENOTIPICA DEI CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO RESISTENTI E METICILLINO SENSIBILI ISOLATI DA SUINO: SENSIBILITA' AGLI ANTIMICROBICI, BIOTIPIZZAZIONE E STUDIO DEL BIOFILM

BIOFILM FORMATION, BIOTYPING AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING IN METICILLIN RESISTENT AND IN METICILLIN SENSITIVE STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM SWINE

COCCHI M*., DI GIUSTO T.*, USTULIN M.**, DEOTTO S.**, DRIGO I.***, CONEDERA G.**, VIO D.**

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Udine*
*** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Pordenone*
**** * Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Treviso*

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, biofilm, biotipo, suino
Key words: Biofilm formation, *Staphylococcus aureus*, biotyping, swine

Riassunto. *Staphylococcus aureus* (SA) è un microrganismo che può causare patologie di diversa gravità sia nell'uomo che negli animali. La virulenza è legata a diversi fattori: produzione di tossine, fattori extracellulari ed enzimi che permettono al microrganismo di resistere ad una o più classi di antimicrobici. In particolare, la meticillino resistenza, valutata in laboratorio tramite l'utilizzo dell'oxacillina, permette di differenziare ceppi MRSA, *methicillin- resistant Staphylococcus aureus* e ceppi MSSA, *methicillin- susceptible Staphylococcus aureus*. I ceppi MRSA sono dotati di maggiore virulenza e resistenza a molte classi di antimicrobici. Scopo del presente lavoro è stato studiare ceppi MRSA e MSSA isolati dal suino caratterizzandoli fenotipicamente con il test di sensibilità agli antimicrobici, lo studio del biotipo e della formazione del biofilm. I risultati hanno mostrato un'elevata presenza di antibiotico resistenza in tutti i ceppi testati, anche se con percentuale maggiore nei ceppi MRSA. Il biotipo mixed CV-C era quello maggiormente rappresentato in entrambe le categorie, anche se in percentuale maggiore nei MRSA. Il biotipo bovino era inoltre presente solo fra i ceppi MRSA. Nessun ceppo formava il biofilm. La caratterizzazione fenotipica degli isolati ha permesso di ottenere informazioni che dovranno comunque essere approfondite con successive indagini, i n particolare di tipo molecolare (presenza di geni codificanti per il biofilm).

Abstract. *Staphylococcus aureus* (SA), is a common cause of infections both in humans and in animals. The virulence of SA is associated with its ability to produce toxins, other extracellular factors and to develop resistance to some drugs. In particular the resistance to methicillin constitutes a public health concern. Based on the oxacillin test, the SA strains were divided in resistant strains (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) and susceptible strains (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA). The MSRA group includesmore virulent and multidrug resistant strains. In this study, 44 SA strains isolated from swine were submitted to oxacillin test in order to distinguish MRSA and MSSA. Subsequently, a phenotypic characterization, evaluating the slime production, the biotype and the susceptibility to some molecules was performed. Results indicate that 10/44 (23%) strains belonged to MRSA. The mixed CV- C biotype was the most frequently identified both in MRSA and in MSSA strains,

while one MRSA belonged to bovine biotype. High prevalence of resistance against penicillin, ampicillin and tetracycline was found, but in MRSA strains the value was much higher. CRA test revealed that no strains were positive for biofilm formation. This study allowed a phenotypic analysis of SA strains isolated from swine: others studies (genetic analysis)are necessary in order to establish the potential ability to form biofilm.

INTRODUZIONE

S. aureus è un microrganismo commensale presente normalmente sulla cute e sulle mucose dell'uomo e degli animali; in presenza di fattori predisponenti può dare infezioni di diversa gravità che possono colpire differenti distretti organici e causare batteriemia. Nel suino *S. aureus* è responsabile di mastite, vaginite, metrite e formazione di ascessi in seguito a fenomeni batteriemici (B. E. Straw, 2006). Numerose sono le sostanze extracellulari elaborate dagli stafilococchi, fra le quali si ricordano coagulasi, ialuronidasi, stafilochinasi ed emolisine che permettono al microrganismo di svolgere la sua azione patogena. La presenza inoltre di enzimi quali la b-lattamasi extracellulare rende il microrganismo resistente a talune classi di beta lattamici (Farina, Scatozza, 1998): ceppi di *S. aureus* hanno mostrato un elevato grado di resistenza poco tempo dopo l'introduzione della penicillina a fini terapeutici. Analogamente, il primo caso di isolamento di ceppi di *S. aureus* resistente alla meticillina fu identificato nel 1961 solo dopo due anni dalla introduzione della meticillina nella pratica clinica. I ceppi di *S. aureus* che presentano resistenza alla meticillina sono definiti methicillin- resistant Staphyloccoccus aureus (MRSA), mentre quelli sensibili alla molecola sono chiamati methicillin- susceptible Staphyloccoccus aureus (MSSA). I ceppi MRSA presentano elevata virulenza e resistenza a diverse classi di antimicrobici, rendendo l'approccio terapeutico difficoltoso. Nell'uomo ad esempio la batteriemia sostenuta da ceppi MRSA causa una mortalità più elevata di quella causata da ceppi MSSA (Cosgrove S.E. *et al.,* 2003). Nonostante diversi studi sottolineino come MRSA sia soprattutto un patogeno umano, recentemente la tipizzazione molecolare ha messo in evidenza che alcuni cloni sono ampiamente diffusi fra uomo e animale (Hunter *et al*., 2010). Studi condotti in alcuni paesi europei (Paesi Bassi, Danimarca, Belgio) hanno dimostrato la presenza e in taluni casi una elevata incidenza di ceppi MRSA nei suini e negli addetti di questo comparto zootecnico, rendendo questi ceppi di grande interesse per la sanità pubblica (Van Den Broek I.V.F. *et al*., 2008). Inoltre, secondo una recente indagine condotta in Italia da Battisti *et al* (2010) il suino può rappresentare il reservoir di ceppi meticillino resistenti.

Diversi sono gli approcci utilizzati in laboratorio per caratterizzare i ceppi di *S. aureus*, sia fenotipici che molecolari. Nel settore cunicolo, ad esempio, grande attenzione è stata rivolta allo studio dei ceppi ipervirulenti di *S. aureus* ed allo sviluppo di sistemi diagnostici che ne permettono l'individuazione al fine di una eradicazione dello stesso dagli allevamenti dove può causare gravi perdite economiche (Agnoletti, 2009). Questi ceppi, comunemente indicati con l'acronimo HVSA (High virulence *Staphylococcus aureus*), si differenzierebbero dai ceppi a bassa virulenza (LVSA: Low virulence *S. aureus*) per una maggiore adesività ai tessuti dell'ospite, probabilmente legata alla presenza di specifiche adesine di superficie (MSCRAMMS, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Vancraeynest *et al*., 2006). Per la caratterizzazione dei ceppi di *S aureus* sono stati utilizzati metodi di caratterizzazione fenotipica, come ad esempio la biotipizzazione, lo studio dell'antibiotico resistenza e della formazione del biofilm. Recentemente, una più approfondita conoscenza è stata offerta dall'utilizzo di tecniche biomolecolari, PFGE ad esempio, con l'analisi di *marker* genetici di virulenza.

Scopo del presente lavoro è stato quello di tipizzare fenotipicamente ceppi MRSA e MSSA di *S. aureus* meticillino sensibili e ceppi meticillino resistenti studiandone il profilo di antibiotico resistenza, biotipo e presenza del biofilm.

MATERIALI E METODI

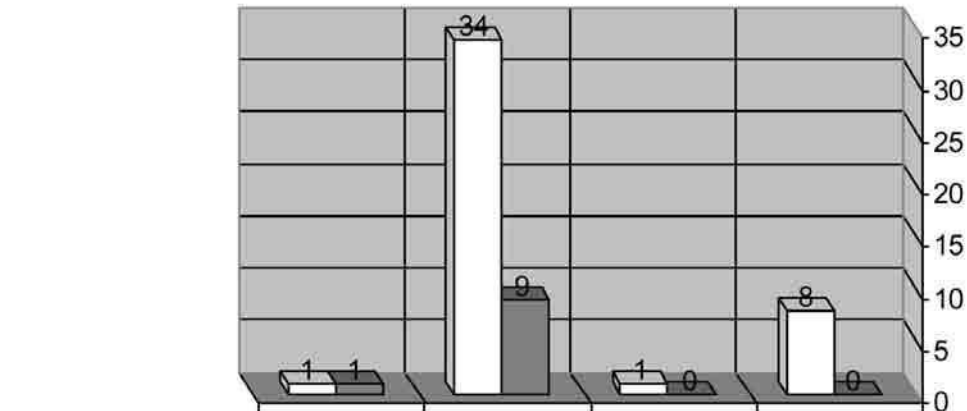
44 ceppi di *S. aureus* isolati dal suino, previamente identificati e facenti parte della ceppoteca di laboratorio sono stati sottoposti alla ricerca della meticillino resistenza. A tal fine è' stato utilizzato il test dell'agar diffusione, introducendo un dischetto di oxacillina (OXA, 10 mg – Becton Dickinson -), secondo quanto descritto dal Clinical and laboratory standards institute (CLSI). I ceppi resistenti sono stati confermati con l'analisi molecolare per la ricerca del gene *mecA*, eseguita secondo quanto descritto da Louie *et al*, 2002. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). Tutti I ceppi ottenuti sono stati successivamente sottoposti ai seguenti tests di caratterizzazione fenotipica:

- Test di sensibilità agli antimicrobici. E' stato condotto usando il metodo dell'agar diffusione, in accordo con le linee guida del CLSI. I principi attivi utilizzati sono stati i seguenti: penicillina (P, 10 mg – Becton Dickinson-), ampicillina (AMP, 10 mg – Becton Dickinson -), tetraciclina (TE, 30 mg – Oxoid -), sulfametoxazolo+trimethropim (SXT, 1,25 mg – Oxoid -). Gli isolati sono stati classificati in sensibile, intermedio, resistente, in accordo con quanto riportato dal CLSI.
- Analisi della formazione del biofilm. Detta indagine è stata effettuata tramite l'utilizzo del Congo Red Agar (CRA). Le piastre di CRA sono state allestite addizionando 0.8 g di rosso Congo (Sigma) e 36 g di saccarosio (Sigma) a 11 g di Brain Heart Infusion agar (Oxoid). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37± 2°C, in condizioni di aerobiosi e successivamente poste, *overnight*, a temperatura ambiente per ulteriori 24-48 ore. La valutazione delle colonie si è basata su un'evidenza colorimetrica: le colonie producenti biofilm apparivano nere/nero-grigie/grigie su fondo rosso, mentre le colonie non producenti il biofilm apparivano rosa/rosso su fondo scuro. Quali controlli di reazione sono stati associati i seguenti ceppi: controllo positivo: *S. epidermidis* ATCC 35984 e controllo negativo: *S. epidermidis* ATCC 12228.
- Biotipizzazione. E' stata eseguita secondo quanto descritto da Devriese (1984). Partendo da una colonia di *S. aureus* sono state allestite le seguenti prove: test per la beta-emolisi, stafilochinasi, coagulazione del plasma bovino, e la reazione al cristal violetto. In tabella 1 sono sintetizzate i criteri interpretativi utilizzati nelle reazioni descritte.

Tabella 1. Criteri interpretativi per l'assegnazione del biotipo

BIOTIPO	β-EMOLISI	CRISTALVIOLETTO	STAFILOCHINASI	COAGULAZIONE DEL PLASMA BOVINO
UMANO	+/-	**C**	+	-
BOVINO	+	**A**	-	+
OVINO	+	**C**	-	+
AVIARIO	-	**A**	-	-
MIXED CV-C	+	**C**	-	-
MIXED CV-A	+	**A**	-	-
	+	**A**	+	-
	-	**A**	+	-
NON TIPIZZABILE	-	**C**	-	-

Legenda
+, presenza; - assenza; C, cristal-violetto tipo C; A, cristal-violetto tipo A



	bovino	mixedcv-c	nt	ovino
Biotipi identificati	1	34	1	8
MRSA	1	9	0	0

RISULTATI

Meticillino - resistenza. 10/44 (23%) ceppi presentavano resistenza all'oxacillina; il dato fenotipico è stato confermato dall'analisi molecolare.
- Sensibilità agli antimicrobici. Fra i ceppi MSSA, 31/34 (91,18%) erano resistenti a P, AMP, Te, mentre 6/34 (17,65%) erano resistenti a SXT. 28/34 (82,35%) erano resistenti a P+AMP+Te, mentre 6/34 (17,65%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT. Tutti i ceppi MRSA erano resistenti a penicillina, ampicillina, e tetraciclina, e di questi 3 (30%) risultavano resistenti anche al SXT. Fra i ceppi MRSA, 10/10 erano resistenti a P, AMP, Te, 3/10 (30%) erano resistenti a SXT e 2/10 intermedi alla stessa molecola. Tutti i ceppi MRSA erano resistenti a P+AMP+TE (100%), mentre 3/10 (30%) erano resistenti a P+AMP+TE+SXT.
- Analisi della formazione del biofilm. Tutti i ceppi hanno dato esito negativo alla ricerca del biofilm.
- Biotipizzazione. La biotipizzazione ha dato I risultati descritti in figura 3.

Come emerge dall'analisi eseguita, fra i ceppi di *S. aureus* identificati nel suino 34/44 (77,27%) appartenevano al biotipo mixed CV-C e 8/44 (18,18%) al biotipo ovino. I due restanti ceppi erano biotipo bovino (1/44) e non tipizzabile, NT (1/44). In particolare, fra i ceppi MRSA, 1/10 (10%) apparteneva al biotipo bovino e 9/10 (90%) a quello mixed CV_C Nessun ceppo MRSA apparteneva ai biotipi ovino e NT. Fra i ceppi MSSA 25/34 (73,53%) erano biotipo mixed CV_C, mentre 8/34 (23,53%) erano ovino e 1/34 (2,94%) risultava non tipizzabile. Nessun ceppo MSSA apparteneva al biotipo bovino.

DISCUSSIONE

In questo studio sono stati sottoposti ad indagine fenotipica 10 ceppi MRSA e 34 ceppi MSSA. Fra i ceppi studiati emerge una elevata percentuale di ceppi MRSA resistenti sia

alle singole molecole testate che a più classi di antimicrobici, contemporaneamente, rispetto ai ceppi MSSA. L'analisi del biotipo, inoltre, evidenzia che fra i ceppi suini quello più diffuso è il biotipo mixed CV-C. Tutti i ceppi MRSA caratterizzati dal biotipo mixed CV_C risultano resistenti a P, AMP, TE e 22.22% anche a SXT. Diversamente nei ceppi MSSA appartenenti al biotipo mixed CV_C, la resistenza a P e AMP é pari al 96%, mentre è pari all'88% per la TE e al 4% nel caso del sulfamidico potenziato. Analogamente, l'analisi della multiresistenza evidenzia valori percentualmente più elevati nei ceppi MRSA biotipo mixed CV-C rispetto ai ceppi MSSA. Il biotipo mixed CV-C è stato ampiamente studiato in altre specie animali, ad esempio nel coniglio. Secondo alcuni autori, infatti, la presenza di adesine di superficie (MSCRAMMs) in grado di amplificare la contagiosità dell'infezione (Vancraeynest *et al*., 2006) caratterizzerebbe i ceppi HV-SA appartenenti al biotipo Mixed CV-C (Agnoletti *et al*., 2007). I risultati delle analisi condotti su ceppi di *S. aureus* isolati da coniglio, evidenziano risultati non concordi fra i diversi groppi di lavoro, riguardo una maggiore frequenza di taluni geni (geni *bbp selm* e della sequenza *flank*) nei ceppi appartenenti al biotipo mixed CV-C rispetto ai ceppi appartenenti ad altri biotipi. (Agnoletti *et al*., 2009; Vancraeynest *et al*., 2007). Queste differenze sottolineano da un lato un probabile ruolo nelle caratteristiche di virulenza di *S. aureus,* anche se la contemporanea presenza dei geni non può costituire un *marker* esclusivo di patogenicità.

Per quanto riguarda l'analisi della formazione del biofilm, l'utilizzo del CRA test ha permesso di ottenere informazioni di tipo qualitativo sulla presenza del biofilm nel ceppo batterico in esame. Secondo Amorena *et al* (1999) i batteri presenti nel biofilm risultano maggiormente resistenti agli agenti antimicrobici rispetto ai batteri della stessa specie in coltura libera. Lo studio del biofilm costituisce elemento importante nell'analisi della virulenza dei ceppi di SA, come ad esempio hanno dimostrato studi condotti su ceppi identificati da latte mastitico bovino, in cui la formazione del biofilm, consentendo l'adesione dei microrganismi alla superficie mucosale, determina una persistenza dell'infezione stessa e una aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici (Melchior MB *et al*., 2006). La formazione del biofilm viene regolata a livello genetico *dall'intracellular adesion (ica) locus*: esso controlla la sintesi di una molecola di natura polisaccaridica, *polysaccharide intercellular adhesin*, PIA, che permette l'adesione intercellulare ((Mack D. et al., 1996). L'*ica locus* è costituito dai geni *icaADBC* e codifica proteine che mediano la sintesi di PIA nei ceppi di SA. L'analisi fenotipica condotta evidenzia la presenza di soli ceppi non formanti il biofilm. L'assenza di espressione del fattore potrebbe essere imputato a differenti elementi: Baselga *et al.* (1993) hanno dimostrato come l'espressione fenotipica del biofilm risenta delle condizioni di coltivazione del microrganismo, come ad esempio l'atmosfera di incubazione. Arciola *et al* (2002), inoltre, descrivono ceppi fenotipicamente "biofilm negativi, genotipicamente positivi", in cui la mancata espressione genica è associata ad una mutazione puntiforme o a fattori interferenti l'espressione genica stessa. L'espressione del *locus* genico è infatti, altamente variabile, influenzato ad esempio da riarrangiamenti genomici.

CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di valutare il pattern fenotipico in ceppi di SA isolati da suini; a tal fine sono stati scelti come markers fenotipici lo studio dell'antibiotico resistenza, la produzione del biofilm e la determinazione del biotipo. Per diverso tempo, *S. aureus* è stato caratterizzato utilizzando solamente metodi basati sullo studio del fenotipo, p.e. tipizzazione fagica, biotipo e pattern di antibiotico resistenza. Questi metodi presentano limiti quali un basso potere discriminatorio e una modesta riproducibilità, imputabile alla mancata espressione del tratto in esame. Attualmente, i ceppi di *S. aureus* vengono perciò tipizzati con l'ausilio

di metodi biomolecolari, p.e. PFGE, caratterizzate da elevata riproducibilità e da elevato potere discriminatorio. Emerge quindi la necessità di migliorare i metodi di indagine per la caratterizzazione di *S. aureus*, utilizzando metodi biomolecolari, dotati di maggiore sensibilità e specificità rispetto a quelli fenotipici. Si sottolinea che tuttavia, nonostante i limiti sopraccitati, hanno permesso di differenziare ceppi MSSA e MRSA del suino in termini di biotipo e biotipo/ resistenza agli antimicrobici.

BIBLIOGRAFIA

Amorena B., Gracia E., Monzon M., Leiva J., Oteiza C., Perez M., Alabart J.L., Hernandez-Yago J. (1999). Antibiotic susceptibility for *Staphylococcus aureus* in biofilm developed in vitro. J Antimicrob. Chemother. 44. 43-55.

Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Cervellati M., Donati E., Montanari L. (2002). Detection of slime production by means o fan aoptimised Congo Red gar plates based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate genotyped for ica locus. Biomaterials.23. 4233-4239.

Baselga R., Albizu I., De La Cruz M., del Cacho E., Barberan M., Amorena B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. Infect Immun. 61: 4857-4862.

Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Feltrin F, Zini M, Aarestrup FM. (2010). "Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings**."** Vet Microbiol. 19;142 (3-4):361-366.

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

Devriese L.A. (1984). "A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species". J Applied Microbiol. 56:215-220.

Drigo I., Bacchin C., Amato S., Bano L., Bonci M., Dalla Pozza M.C., Deotto S., Ferro T., Guolo A., Marcon B., Agnoletti F. (2009). "Impiego della PFGE per lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da *Staphylococcus aureus* nel coniglio" Giornate di coniglicoltura ASIC 2009, 2-3 aprile 2009. Forlì, 61-63.

Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E. N., Schwaber M. J., Karchmer A. W., Carmeli Y. (2003) "Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia:A Meta-analysis". Clinical Infectious Diseases. 36:53–9

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). M31-A3. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Vol 28. n 8.

Costerton J.w., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284. 1318-1322.

Farina R., Scatozza F. (1998). “Trattato di malattie infettive degli animali” Vol 1. Seconda edizione, Utet; Torino.

Hunter P.A., Dawson S., French GL et al. (2010). ” Antimicrobial-ressitant pathogens in animals and man:prescribing, practices and policies. J Antimicrob Chemother. 65:13-17.

Vancraeynest D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemauwe, C., Hermans, K., (2006). “International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone”. J. Vet. Med. 53: 418-422.

Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Hermans, K. (2007). Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. Vet. Microbiol. 121:368-372.

VAN Den Broek IV, Van Cleef BA, Haenen A, Broens EM, Van Der Wolf PJ, Van Den Broek MJ, Huijsdens XW, Kluytmans JA, Van De Giessen AW, Tiemersma EW. (2009) “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms.” Epidemiol Infect. 137(5):700-708.

Louie L., Goodfellow, J., Mathieu P., Glatt, A., Louie M., Simor, AE, (2002). Rapid detection of methicillin resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol, 40(8): 2786-2790.

Mack D., Haeder M., Siemssen N., Laufs R. (1996). Association by biofilm production of coagulase negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesine. J Infect Dis 174 (4). 881-884.

Melchior M. B., Gremmels J.F., Gaastra W. (2006). Comparative assesment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B. 53. 326-332.

CIRCOLAZIONE DI *Brucella suis* NEGLI ALLEVAMENTI DI CINGHIALI NELLA REGIONE MARCHE

Brucella suis INFECTION IN WILD BOARS HERDS IN MARCHE REGION

COSTARELLI S.[1], GAVAUDAN S. [1], SENSI M. [1], MARILUNGO L.[2], MORELLI M.S. [2], PANICCIÀ M. [1], ANTOLINI A.. [1], D'ANGELO G. [1], BARCHIESI F. [1], MAGISTRALI C.F[1].

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche- Perugia;
[2] Azienda Sanitaria Unica Regione Marche, Servizio veterinario

Parole chiave: *Brucella suis*, cinghiale, biosicurezza, Regione Marche
Key words: *Brucella suis*, wild boar, bio-security, Marche Region

Riassunto
Nella Regione Marche l'allevamento del cinghiale viene adottato da qualche decina di aziende che utilizzano principalmente aree collinari marginali altrimenti inutilizzate. La maggior parte di queste aziende è a carattere estensivo, con una popolazione di cinghiali limitata, allevata all'aperto, in territori recintati. L'allevamento è indirizzato verso la produzione di carne di cinghiale di qualità che si distingue nettamente da quelle provenienti dalla caccia in braccata.
L'organizzazione aziendale varia dalla gestione familiare degli allevamenti più piccoli alla gestione più organizzata simile a quella delle aziende suinicole a carattere estensivo.
Scopo di questo lavoro è stato quello di indagare la presenza di *B. suis* nelle popolazioni di cinghiali degli allevamenti della Regione Marche.
Complessivamente sono stati controllati 9 allevamenti per un totale di 160 capi, effettuando un campionamento di sangue e organi in fase di macellazione. Il siero di ogni animale è stato saggiato in doppio mediante siero agglutinazione rapida al Rosa Bengala Test e Fissazione del Complemento. In caso di sieropositività in SAR e FdC o anche alla sola FdC, gli organi venivano sottoposti ad esame batteriologico per la ricerca di *Brucella* spp..
Capi provenienti da due aziende sono risultati positivi alla FdC e da un esemplare è stata isolata *B. suis*. Nonostante nelle Marche una norma regionale (DGRM 1147/2009) vieti dal 2009 la riproduzione dei capi di cattura, gli allevamenti di cinghiale dovranno implementare quelle norme di biosicurezza che impediscano l'instaurarsi di '*connecting point*' con i suidi selvatici e domestici allevati in maniera estensiva.

Abstract
In the Marche Region, wild boar breeding consists of a few dozens of productive units, used mainly as tools for the recovery of marginal areas and for a better quality of wild boars meat. Most of these units are extensive, with a population of wild boars limited to a few animals, which are kept outdoor in fenced areas. The typology is extremely variable. There are production units, both outdoors or indoors, managed according to intensive pigfarming strategies, together with smaller farms, family run. Aim of this work, was to investigate *B. suis* infection within wild boar herds in Marche Region.
Nine farms, for a total of 160 heads, were checked at slaughter house. The serum of each animal was assayed in duplicate using Rapid Serum Agglutination Test (SAT) and Complement Fixation Test (CFT).

Organs from CFT positive animals, were bacteriologically tested for *Brucella* spp. detection. Animals from two different herds resulted positive by CFT and *Brucella suis* was isolated in one animal..
In Marche Region a regional law (DGRM 1147/2009) is regulating wild boar breeding and trapped animals since 2009. banning the last category from reproduction. Nenevertheless the low biosecurity farms could act s a 'connecting point' between pathogens of the wild population and the domestic one.

INTRODUZIONE

In Italia la presenza *Brucella* spp. in cinghiali selvatici è stata documentata a più riprese nel corso degli ultimi anni in diverse realtà regionali (Gennero et al., 2006; Alongi et al., 2008; Rugna et al., 2011; Addis et al., 2011) ; tale positività è generalmente da ricondursi alla presenza di *Brucella suis* biovar 2, che rappresenta un rischio contenuto per l'uomo in quanto dotata di scarse potenzialità zoonosiche. Tuttavia, in Piemonte, seppure in un territorio circoscritto, è stata dimostrata la presenza di infezione da *B. melitensis* e *B. suis* biovar 1; quest'ultima è stata segnalata anche in Sardegna (Addis et al. 2010) .
La circolazione di *Brucella* spp. nelle popolazioni selvatiche rappresenta quindi un pericolo potenziale per l'uomo ed in particolare per i cacciatori ma anche per gli animali domestici, per la possibilità di reintrodurre l'infezione negli allevamenti.
L'introduzione di *Brucella* spp. all'interno della popolazione domestica di suini può realizzarsi attraverso il contatto con le popolazioni selvatiche: gli allevamenti out-door, in particolare se localizzati in zone boschive, rappresentano quindi il principale fattore di rischio, come dimostrato dai focolai registrati nel corso degli ultimi anni in Europa (Anonimo, 2009c).
Nella regione Marche, un monitoraggio sierologico effettuato nel periodo 2002-2007 aveva segnalato la presenza di sieropositività per *Brucella* spp. nei cinghiali provenienti anche da Aree protette di regioni limitrofe.
Tali animali provenivano da recinti di cattura e, dopo essere trasferiti per un breve periodo d'ingrasso presso allevamenti marchigiani, erano destinati unicamente alla macellazione.
Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di verificare la presenza dell'infezione da *Brucella* spp. in allevamenti della Regione Marche.

MATERIALI E METODI

I cinghiali sottoposti a prelievo erano capi macellati in stabilimenti autorizzati della Regione Marche nel periodo marzo-dicembre 2011.
In sede di macellazione da ogni capo sono stati prelevati il sangue, la milza, le tonsille, l'utero o i testicoli; i feti qualora presenti.
Per ogni partita è stata compilata un'apposita scheda anamnestica con notizie relative al soggetto e all'allevamento di origine riservando particolare attenzione a quelle rilevanti ai fini della circolazione di *B. suis*.
Ogni siero è stato sottoposto a SAR e FdC (Anonimo 2009a, Anonimo 2009b). A fronte di una positività in SAR e FdC o anche alla sola FdC si è proceduto a sottoporre gli organi all'esame colturale e all'eventuale conferma in PCR da colonia.
L'esame batteriologico per *Brucella* spp. è condotto sulla base di quanto indicato dal Manuale OIE (Anonimo 2009a, Anonimo 2009b). In breve, i campioni di tessuto sono stati frammentati mediante Stomacher in PBS (Phosphate Buffered Saline) in proporzione 1:9, quindi la sospensione è stata inoculata in Agar sangue e Brucella agar selettivo (Farrell's medium) e le piastre incubate a 37°C±1°C in aerobiosi e microaerofilia (8% CO2) per una settimana; 0,1 mL della sospensione sono state inoltre inoculate in 9 mL di Brucella Brodo selettivo

(Farrell's broth) ed incubate a 37°C±1°C in microaerofilia (8% CO_2). In seguito, in caso di negatività alla semina diretta, dai brodi colturali sono state allestite subcolture settimanali in Agar Sangue e Agar Brucella, successivamente incubate a 37°C±1°C in microaerofilia (8% CO_2). Tali subcolture sono state allestite per 6 settimane a partire dal momento dell'inoculo al termine delle quali sono state considerate negative. Quindi, le colonie con morfologia riconducibile al genere *Brucella* sono state sottoposte a PCR per identificazione di genere e specie secondo la metodica descritta da Garcia Yoldi D. et. al. (2006), e infine inviate per l'individuazione della bio variante al centro di Referenza per la Brucellosi presso l'IZS Abruzzo e Molise.

RISULTATI

Il numero delle aziende di cinghiale esaminate nella Regione Marche ed i relativi risulatati, sono riportati in Tabella 1

Tab. 1: aziende di cinghiale esaminate nella Regione Marche nel 2011 e relativi risultati
Table 1*: wild boar farms sampled in Marche Region, year 2011, and results*

ALLEVAMENTI CINGHIALE - Marche	
N° aziende saggiate	9
N° capi saggiati	160
N° capi positivi SAR	6
N° capi positivi in FDC	11*
N° aziende positive FDC	2 (22%)
N° capi positivi isolamento	1 (0.6%)
N° aziende positive isolamento	1 (11%)

* 6 già positivi in SAR

Le sieropositività registrate, sia in SAR sia in FDC, sono da ricondurre a capi di 3 allevamenti distinti:

A: nel primo allevamento, su 15 animali inviati al macello, si sono registrate 2 positività in SAR.

La FdC eseguita su tutti gli animali ha dato esito negativo, motivo per cui non si è proceduto con l'isolamento batterico.

B: nel secondo allevamento su 12 cinghiali inviati al macello, un capo ha reagito positivamente sia alla SAR che alla FdC, altri tre capi hanno reagito positivamente solo alla FdC.

C: il terzo allevamento ha inviato al macello 20 cinghiali. Di questi, tre animali hanno dato SAR e FdC positivi; quattro sono risultati positivi alla FdC. I titoli hanno oscillato tra i valori di 26,6 UISC/ml e 265,6 UISC/ml

Tab. 2: animali con reazione positiva a SAR e/o FdC nelle tre aziende positive
Table 2*: positive animals to SAT and/or CFT into the three positive farms*

	Solo SAR +	**SAR + / FDC+**	**Solo FDC +**
Azienda A	2	0	0
Azienda B	0	1	3
Azienda C	0	3	4*
	2	4	7

* in uno dei 4 animali è stata isolata *B. suis*

Gli organi degli 11 animali positivi in FDC sono stati processati per l'isolamento batterico. Erano tutti soggetti di età compresa tra 12 e 24 mesi, 7 femmine e 4 maschi.
Nessuna delle schede anamnestiche raccolte riportava episodi di aborti epidemici a carico delle aziende campionate, nemmeno in quelle in cui si sono registrate sieropositività o l'isolamento batterico. L'esame anatomopatologico effettuato al macello non ha evidenziato lesioni macroscopiche a carico degli organi bersaglio di *B. suis* quali milza, fegato, testicoli, né lesioni riconducibili a brucellosi.
La tabella 3 evidenzia la suddivisione degli animali in sieropositivi e sieronegativi, suddivisi per fasce d'età e sesso. Essendo animali destinati al macello la maggior parte dei capi rientrava nella fascia d'età sub-adulta (1-2 anni) mentre il numero di animali dei due sessi è pressoché equivalente.
Il maggior numero di sieropositività si sono apprezzate nei soggetti compresi tra 1 e 2 anni (12/95: 12,6%) e in capi oltre i due anni di età (1/19 : 5%). Negli animali giovani non sono state evidenziate sieropositività.
Dalle tonsille di un soggetto di sesso femminile, di 2 anni di età, sierologicamente positivo in SAR ed FdC con un titolo pari a 265,6 UISC/ml, l'isolamento colturale ha dato esito positivo per *B. suis.*

Tab. 3: risultati sierologici divisi per sesso ed età. La sieropositività (Siero+) è intesa come reazioni FDC+ e/o SAR+)
Tab. 3*: *serological results divided by age and sex;

	< 1 aa		**1-2 aa**		**> 2 aa**		
	Siero+	Neg.	Siero+	Neg.	Siero+	Neg.	**Tot.**
Femmine	0	8	8	54	1	12	83
Maschi	0	25	4	41		7	76
	0	33	12	95	1	19	160

L'azienda di provenienza del capo risultato positivo all'isolamento produce prevalentemente selvaggina minuta (fagiano e lepre) e selvaggina ungulata. Consta di più unità produttive allevate all'aperto, separate per specie da recinti a rete con maglia romboidale (4x4 cm), doppia per un'altezza di circa mezzo metro e interrata di 40 cm.
I gruppi presenti sono costituiti da:
- circa 60 cinghiali, tra riproduttori e animali in accrescimento.
- circa 70 cinghiali in finissaggio, provenienti da "catture con chiusini" in aree protette, introdotti in allevamento previa identificazione con marca auricolare individuale e mantenuti separati per sesso fino alla macellazione.
- alcune decine di suini di razza locale (capi riproduttori e in accrescimento);

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
Nel corso dell'indagine è emersa la difficoltà di diagnosticare *B. suis* negli allevamenti di cinghiali.
Per quanto riguarda i test sierologici infatti, 11 animali hanno dato sieropositività alla FDC a fronte di 4 cinghiali SAR positivi, confermando l'importanza di procedere con i test sierologici in parallelo (SAR e FDC) al fine di aumentare la sensibilità delle prove. In un'indagine simile Dondo e coll. (2003) hanno ottenuto isolamenti di *Brucella* spp. in cinghiali negativi alla SAR e positivi alla FDC, negativi alla FDC e positivi alla SAR o negativi ad entrambe le prove.
Nell'azienda risultata positiva per *B. suis,* la SAR ha dato reazione inequivocabilmente

positiva. Questo fatto, insieme ai titoli di fissazione così elevati in tutti i soggetti positivi, ha fatto ipotizzare che *B. suis* fosse presente in elevate prevalenze intra-aziendali. L'isolamento di *B. suis* ha tuttavia dimostrato l'infezione in un solo capo dei 4 che hanno avuto le medesime reazioni sierologiche. Tale aspetto è anche da imputarsi a caratteristiche colturali; *B. suis* appare infatti sensibile ad alcuni fattori selettivi addizionati ai terreni per Brucella (De Miguel, 2011) e, rispetto ad altre specie dello stesso genere, è maggiormente sensibile alle basse temperature di conservazione delle matrici di partenza. Questi elementi possono rendere ragione del basso numero di isolamenti ottenuti comparandoli con le positività all'esame sierologico.
In tutti i casi da noi osservati, non è stato possibile rilevare lesioni a carico di organi e tessuti a conferma che la patogenicità di *B. suis* biovar 2 nel cinghiale è più limitata di quanto non lo sia nel suino. In questa specie è possibile apprezzare lesioni granulomatose o ascessi epatici, splenici, testicolari, che possono essere del tutto assenti nel cinghiale dove le infezioni sono generalmente a carattere latente (Miller and Paige, 1998).
Vista la difficoltà di emettere già il solo sospetto della presenza dell'infezione in allevamento o in sede di macellazione, risulta plausibile una notevole sottostima dell'infezione, se non altrimenti indagata attraverso specifici piani di monitoraggio. Questi andrebbero comunque integrati da apposite norme atte a ridurre il rischio di trasmissione di *B. suis* da animali provenienti da catture alle altre specie recettive allevate, tutelando concretamente sia gli aspetti di gestione faunistica che le esigenze commerciali relative a questa specie. Da questo punto di vista la Legge Regionale della Regione Marche (DGRM 1147/2009) rappresenta un punto di partenza necessario per l'implementazione delle norme di biosicurezza degli allevamenti di cinghiali in quanto ci appaiono numerosi i punti critici che ancora insistono su questi allevamenti. La "criticità" di ogni singola azienda, infatti, può condizionare il livello di rischio di un intero territorio e in questo contesto certe realtà di allevamento possono costituire dei veri e propri "*connecting points*" fra i patogeni presenti nel mondo silvestre e quelli delle popolazioni domestiche dei suidi.

BIBLIOGRAFIA

Anonymous (2009a) Bovine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf

Anonymous (2009b) Porcine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf

Anonymous (2009c) Scientific opinion of the Panel on Animal health and Welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). The EFSA Journal 1144, 1-112

Addis G., Cannata P., Deidda M., Cogoni M., Crobeddu S. Trincas M., Pilo C., Liardi M., Aloi D., Rolesu S. (2010) Sieroprevalenza di Brucella spp. in cinghiali catturati durante l'annata venatoria 2009-2010 nel sud della Sardegna. Atti del XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Genova, 27-29 ottobre 2010: 126-127.

Alongi C, Spazziani A, Zulato B, Deiana A, Frongia M, Orrù G, Liciardi M. (2008); "Isolamento di Brucella suis in allevamenti suini della Sardegna"; X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. (2011) Development of a selective culture medium for primary isolation of the main Brucella species. J Clin Microbiol. 2011 Apr;49(4):1458-63

Regione Marche- Giunta regionale DGRM 1147/2009 (2009) 'Misure per la gestione sanitaria e lo spostamento dei cinghiali selvatici catturati vivi'.

Dondo A., Grattarola C., Gennero S., Zoppi S., Di Giannatale E. (2003) Osservazioni preliminari sulla presenza di Brucella suis biovar 1 nel Piemonte. Il Progresso Veterinario Anno LVIII, n° 3.

Garcia-Yoldi D., Marin C.M., De Miguel P.M., Munoz P.M., Vizmanos J.L. & Lopez-Goni I. (2006) "Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all Brucella species and the vaccine strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1"; Clin. Chem., 52, 779–781.

Gennero M. S., Grattarola C., Bergagna S., Zoppi S., Barbaro A., Dondo A. (2006). "Trend of Brucella suis infection in wild boar in Piedmont region (2002–2005)". Epidemiologie et Sante´ Animale 49: 59–62.

Miller, M. A., and J. C. Paige, 1998: Other food borne infections. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 14, 71–89.

Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M.L., Pongolini S., Sozzi E., Tamba M., Vicari N., Merialdi G. (2011) Monitoraggio sanitario della popolazione di cinghiali (Sus scrofa) in Emilia Romagna. Risultati degli anni 2006-2010. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento del Suino, XXXVII Meeting Annuale, Piacenza: 185-93.

EFFICACIA COMPARATIVA DI VACCINI VERSO *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* E PCV2

COMPARATIVE EFFICACY OF VACCINES AGAINST MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AND PCV2

ALBERTO E. CEVIDALLI[1], FABIO FORESTI[2],

1-MSD Animal Health, Segrate (MI)
2-Medico Veterinario Libero Professionista, Seriate (BG)

Parole chiave: Mycoplasma hyopneumoniae, PCV2, vaccinazione
Key Words: Mycoplasma hyopneumoniae, PCV2, vaccination

Riassunto. La polmonite enzootica indotta da *Mycoplasma hyopneumoniae* è ancora un'evenienza frequente nell'allevamento intensivo del suino. Un metodo relativamente semplice per verificare l'efficacia degli interventi vaccinali verso questo patogeno è la valutazione delle lesioni polmonari Myco-like in sede di macellazione. L'infezione da PCV2 (Porcine Circovirus type 2) è pressoché ubiquitaria negli allevamenti italiani. Negli ultimi anni il decorso di questa infezione è diventato più subdolo e si può manifestare con una varietà di manifestazioni cliniche che tutte insieme vengono denominate PCVAD (Porcine Circovirus Associated Diseases) oppure, in mancanza di fattori scatenanti, l'infezione può decorrere in forma subclinica. Oggigiorno esistono in commercio dei vaccini che permettono di controllare efficacemente questa infezione e i danni che essa comporta. Esistono però delle differenze importanti per quanto riguarda la composizione dei vaccini, sia relativamente all'antigene sia per quanto riguarda l'adiuvante. In questo articolo vengono illustrati i risultati di due studi di campo, dove è stato messo a confronto l'impiego dei vaccini vs. *M. hyopneumoniae* e PCV2, rispettivamente M+PAC™ e Porcilis® PCV, rispetto all'impiego di una associazione di due vaccini analoghi. Il protocollo dello studio 1 ha previsto anche la misurazione dei titoli anticorpali, e sono state riscontrare delle differenze evidenti ed inequivocabili nell'entità della risposta anticorpale a favore di M+PAC™ e Porcilis® PCV, rispetto ai due vaccini analoghi. Inoltre in entrambi gli studi in esame è stata riscontrata una maggiore protezione a livello polmonare dei gruppi vaccinati con M+PAC™. Differenze di tipo clinico e sanitario (perdite, trattamenti individuali) sono state riscontrate nello studio 2, che ha evidenziato dei risultati superiori per il gruppo vaccinato con M+PAC™ e Porcilis® PCV.

Summary. Enzootic pneumonia, induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* is still frequent in industrial swine production. A simple method to evaluate the efficacy of vaccinations against this pathogen is the lung scoring of Myco-like lesions at slaughterhouse. PCV2 (Porcine Circovirus type 2) infection is almost ubiquitous in Italian swine herds. In recent years the course of this infection became more insidious and can appear with a variety of clinical manifestations, that altogether are named PCVAD (Porcine Circovirus Associated Diseases) or, in the absence of triggering factors, the course of PCV2 infection can be sub-clinical. Nowadays several vaccines are present on the market, which can effectively control this infection and the related damages. Nevertheless, important differences between these vaccines exist, which regard their composition, in particular the antigen

and the adjuvant. This paper reports the results of two field trials, in which M+PAC™ and Porcilis® PCV have been compared to a combination of two other vaccines against *M. hyopneumoniae* and PCV2. The protocol of study 1 included the titration of antibodies and thus it has been possible to highlight important differences in the antibodies level in favor of M+PAC™ and Porcilis® PCV, compared to the 2 analogous vaccines. In addition, in both trials a better lung protection induced by M+PAC™ has been found, by comparing the lung scores at slaughter. Clinical and health differences (losses, injectable treatments) between study groups have been found in study 2, in which better results have been obtained by vaccinating piglets with M+PAC™ and Porcilis® PCV.

INTRODUZIONE

La polmonite enzootica indotta da *Mycoplasma hyopneumoniae* è ancora un'evenienza frequente nell'allevamento intensivo del suino.

In un'indagine condotta su un totale di 4889 carcasse appartenenti a 48 lotti di suini pesanti inviati al macello nell'arco di un periodo di 3 mesi e provenienti da allevamenti della pianura padana è stata riscontrata una prevalenza di lesioni *Myco-like* pari al 46,4% (1). Nell'arco degli ultimi anni l'attenzione verso questo patogeno e verso le misure di controllo è andata nella direzione di una maggiore comodità dell'intervento vaccinale, con lo spostamento dai vaccini 2-shot a quelli 1-shot e con la comparsa sul mercato di vaccini associabili ad altre valenze. Tuttavia è importante che la comodità di impiego non vada a scapito dell'efficacia degli interventi vaccinali. Un metodo relativamente semplice per verificare l'efficacia degli interventi vaccinali è la valutazione delle lesioni polmonari *Myco-like* in sede di macellazione. Questo permette anche la concomitante valutazione delle lesioni pleuriche mediante la griglia SPES (2). Infatti, anche la pleuropolmonite continua ad essere presente negli allevamenti suini e nello studio di cui sopra la percentuale di animali con lesioni pleuriche indicative di APP (punteggio SPES $\geq$ 2) è stato pari al 25,1% (1). L'infezione da PCV2 (Porcine Circovirus type 2) è pressoché ubiquitaria negli allevamenti italiani. Recenti dati epidemiologici relativi a 38 aziende suinicole della pianura padana in cui sono stati effettuati dei profili sierologici e di PCR relativamente a PRRSv e PCV2, presentati durante un recente convegno su questo argomento (3), hanno messo in evidenza la presenza dell'infezione nel 100% degli allevamenti. Non sempre l'infezione da PCV2 si manifesta clinicamente come PMWS (*Postweaning Multisystemic Wasting Sindrome*), anzi negli ultimi anni il decorso di questa infezione è diventato più subdolo e si può manifestare con una varietà di manifestazioni cliniche che tutte insieme vengono denominate PCVAD (*Porcine Circovirus Associated Diseases*) oppure, in mancanza di fattori scatenanti, l'infezione può decorrere in forma subclinica, ma è stato dimostrato che viremie da PCV2 ad alto titolo determinano perlomeno un decremento dei risultati produttivi (4,5).

Oggigiorno esistono in commercio dei vaccini che permettono di controllare efficacemente questa infezione e i danni che essa comporta. Esistono però delle differenze importanti per quanto riguarda la composizione dei vaccini, sia relativamente all'antigene sia per quanto riguarda l'adiuvante, che determinano delle evidenti differenze nella risposta anticorpale post-vaccinale (6,7).

In questo articolo vengono illustrati i risultati di due studi di campo, condotti in aziende suinicole della pianura padana, dove è stato messo a confronto l'impiego dei vaccini vs. *M.hyopneumoniae* e PCV2, rispettivamente M+PAC™ e Porcilis® PCV, rispetto all'impiego di una associazione di due vaccini analoghi.

MATERIALI E METODI

Studio 1:

Allevamento e animali

Lo studio si è svolto in un allevamento a ciclo chiuso della pianura padana per la produzione del tipico suino pesante; 683 suinetti di 3 settimane di vita sono stati assegnati in modo casuale a tre differenti gruppi di trattamento come segue:

- 217 sono stati vaccinati, mediante iniezione in due punti di inoculo separati, con M+PAC™ e Porcilis® PCV (gruppo MSD Animal Health);
- 230 sono stati vaccinati con un'associazione di due vaccini vs. *M.hyopneumoniae* e vs. PCV2, di un'altra azienda farmaceutica, mescolati tra loro prima di essere iniettati, come indicato dall'azienda produttrice (gruppo B);
- 236 non sono stati vaccinati e sono serviti da gruppo di controllo.

I suini dei 3 gruppi sono stati contrassegnati individualmente ed allevati mescolati insieme e sono quindi stati sottoposti alle stesse identiche condizioni ambientali e alle stesse dinamiche di infezione.

Oltre alle vaccinazioni obbligatorie contro la malattia di Aujeszky, tutti i suini erano anche vaccinati nei confronti di *A. pleuropneumoniae* mediante due interventi con Porsilis® APP.

Indagini di laboratorio

Allo scopo di valutare la risposta immunitaria alla vaccinazione nei confronti di PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae* e l'andamento dell'infezione naturale, in animali vaccinati con due differenti associazioni di vaccini o non vaccinati, 20 suini per ognuno dei 3 gruppi in prova (60 in tutto) sono stati contrassegnati mediante una seconda marca auricolare e quindi prelevati a 3, 6, 8, 12, 14, 18, 22, 26 e 40 settimane di vita.

Su tutti i campioni di sangue sono stati effettuati gli esami sierologici nei confronti del PCV2 mediante un'ELISA competitiva, ALPHA-PCV, con titoli anticorpali espressi come Log2, e nei confronti di *M.hyopneumoniae* mediante il kit ELISA di Idexx, con risultati espressi come valore S/P. Inoltre, sulla base dei risultati della sierologia vs. il PCV2 si è proceduto alla ricerca e quantificazione del genoma virale di PCV2 sui singoli campioni, mediante PCR quantitativa, espressa in Log10 copie/µL, sugli ultimi 2 prelievi (26 e 40 settimane di vita).

Parametri sanitari

Nel corso dell'intero studio sono stati raccolti i dati relativi alle perdite totali (mortalità e suini scartati).

Valutazione polmonare al macello

I suini di questa prova sono stati sottoposti in sede di macellazione alla valutazione delle lesioni polmonari da *M.hyopneumoniae* (metodo Madec modificato) e al punteggio delle pleuriti (metodo SPES) secondo quanto descritto in Dottori et al. (2), da parte del personale specializzato della sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER.

Analisi statistica

Relativamente alla mortalità, scarti e perdite totali, la comparazione tra i gruppi è stata effettuata mediante riconduzione dei dati al modello lineare generale misto (random log-binomial model) La variabile dipendente del modello era il gruppo di trattamento (fixed effect), mentre la nidiata di origine è stata considerata il fattore casuale (random effect). I

risultati sono espressi come Rischio Relativo (RR) con relativi limiti di confidenza 2-tailed 95% CI e significatività p<0,05.

Per quanto riguarda il punteggio polmonare, le differenze osservata tra i gruppi a confronto sono state comparate tramite test non parametrico Kruskal Wallis con livello di significatività p<0,05.

Studio 2:

Allevamento e animali
392 suini di un allevamento italiano a ciclo chiuso per la produzione del suino pesante sono stati vaccinati a 4 settimane di vita con:

- Gruppo MSD A.H.: M+PAC™ e Porcilis® PCV iniettati in due distinti punti di iniezione (n = 196),

oppure

- Gruppo B: un'associazione di due vaccini vs. *M.hyopneumoniae* e PCV2 mescolati tra loro prima di essere iniettati, come indicato dall'azienda produttrice (n = 196).

I suini di entrambi i gruppi sono stati inoltre vaccinati con Porsilis® PRRS all'età di due settimane e poi sono stati sottoposti alle vaccinazioni obbligatorie verso la Malattia di Aujeszky.

Parametri sanitari
I suini sono stati monitorati fino alla macellazione e oltre ai dati di mortalità e agli scarti sono stati raccolti anche i dati relativi ai trattamenti antibiotici iniettabili.

Valutazione polmonare al macello
Anche i suini di questa prova sono stati sottoposti in sede di macellazione alla valutazione delle lesioni polmonari da *M.hyopneumoniae* e al punteggio delle pleuriti da parte del personale delle sezioni di Reggio Emilia e Bologna dell'IZSLER, cha ha provveduto anche all'elaborazione dei dati.

Analisi statistica
Relativamente alla mortalità, scarti e perdite totali, la comparazione tra i gruppi è stata effettuata mediante riconduzione dei dati al modello lineare generale misto (random log-binomial model) La variabile dipendente del modello era il gruppo di trattamento (fixed effect), mentre la nidiata di origine è stata considerata il fattore casuale (random effect). I risultati sono espressi come Rischio Relativo (RR) con relativi limiti di confidenza 2-tailed 95% CI e significatività p<0,05.
Per quanto riguarda i trattamenti iniettabili, le differenze tra i trattamenti sono state confrontate mediante riconduzione dei dati al modello lineare generale misto (random poisson regression). La variabile dipendente del modello era il gruppo di trattamento (fixed effect), mentre la nidiata di origine è stata considerata il fattore casuale (random effect). I risultati sono espressi come Rischio Relativo (RR) con relativi limiti di confidenza 2-tailed 95% CI e significatività p<0,05.
Per quanto riguarda il punteggio polmonare le differenze osservata tra i gruppi a confronto sono state comparate tramite test non parametrico Kruskal Wallis con livello di significatività p<0,05.

RISULTATI

Studio 1

I risultati delle indagini sierologiche condotte sui 3 gruppi di suini impiegati nello studio hanno evidenziato titoli anticorpali più elevati nel gruppo MSD A.H. rispetto a quanto osservato per il gruppo B e il gruppo di controllo (Fig. 1 e 2).
Nei 3 gruppi è stato riscontrato un rialzo anticorpale tardivo vs. PCV2, oltre le 26 settimane di vita, e oltre le 12-14 settimane di vita per *M. hyopneumoniae*.
Relativamente al rilevamento del PCV2 nel siero degli animali analizzati durante questo studio è stata riscontrata una positività solo nei campioni provenienti da animali di 40 settimane, con un numero di copie genomiche compreso tra 0,7 e 2,5 log10/µL.

Figura 1: *Titoli anticorpali ELISA vs. PCV2.*
Figure 1: *Antibodies' levels (ELISA) against PCV2.*

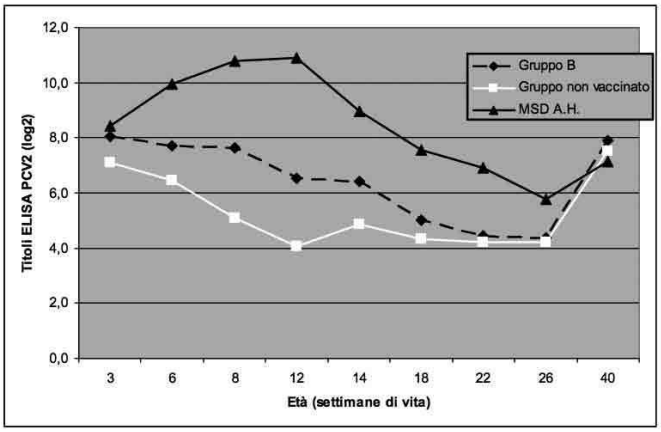
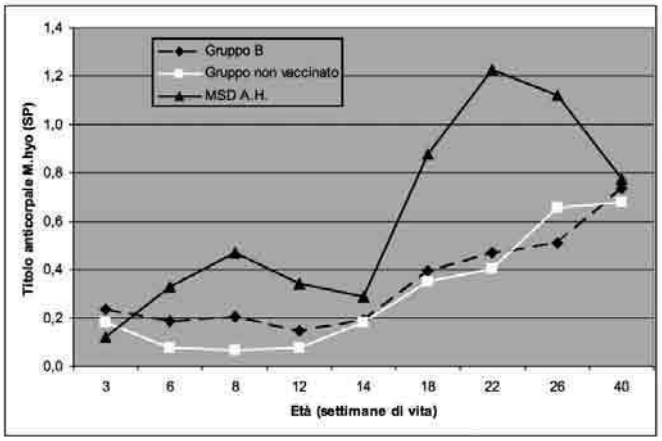


Figura 2: *Titoli anticorpali SP ratio vs. M.hyopneumoniae.*
Figure 2: *Antibodies' levels (SP ratio) against M.hyopneumoniae.*



I dati relativi alle perdite sono riassunti in tabella 1.

	MSD A.H.	Gruppo B	Non vaccinati
Morti (%)	6,5	4,8	8,1
Scarti (%)	3,2	4,3	2,5
Perdite totali (%)	9,7	9,1	10,6

Tabella 1: *Mortalità, % di scarti e % di perdite (morti + scarti) nei 3 gruppi in prova.*
Table 1: *Mortality, % of runts and % of losses (dead + runts) in the 3 trial's group.s*

21 suini nel gruppo MSD A.H. (9,7%), un ugual numero nel gruppo B (9,1%) e 25 (10,6%) suini del gruppo di controllo sono morti o sono stati scartati nel periodo intercorso fino alla macellazione (tab.1).
Sono stati quindi macellati 196 suini del gruppo MSD A.H., 209 del gruppo B e 211 suini del gruppo di controllo.
L'elaborazione statistica dei risultati di questo studio non ha messo in evidenza differenze significative, relativamente alle percentuali di mortalità, di scarti o di perdite totali, tra ognuno dei gruppi vaccinati e quello non vaccinato e tra i due gruppi vaccinati messi a confronto l'uno con l'altro (tab. 2).

Confronto	**Risk Ratio Perdite Totali**	**lower 95% CL**	**upper 95% CL**	**Significatività (P-value)**
Gruppo B vs. MSD A.H.	0.944	0.530	1.680	0.843
Gruppo B vs. non vaccinati	0.862	0.496	1.497	0.597
MSD A.H. vs. non vaccinati	0.914	0.527	1.585	0.747

Tabella 2: *Analisi dell'inferenza statistica tra i tre gruppi in prova (perdite totali) – studio 1.*
Table 2: *Inferential analysis between the three groups (total losses) – study 1.*

Al macello sono stati eseguiti i punteggi polmonari, sia SPES (no differenze significative tra i gruppi) sia Madec, relativamente al quale è stata rilevata una differenza significativa tra Gruppo MSD A.H. e controllo ($p<0,05$) e non tra gruppo B e controllo, e tra gruppo MSD e gruppo B (vedi tabella 3 e figura 3).

Gruppo	**Polmoni con lesioni Myco-like**	**Media ± DS**	**Mediana**
MSD A.H. (M+PAC™ e Porcilis® PCV)	43,5%	0,75 ± 1,19	0
Gruppo B (altri vaccini mescolati)	48%	0,99 ± 1,78	0
Controllo (non vaccinati)	55%	1,19 ± 2,04	1

Tabella 3: *Punteggi polmonari vs. M.hyopneumoniae (metodo Madec modificato)- studio 1.*
Table 3: *M.hyopneumoniae lung scores (modified Madec's method) – study1.*

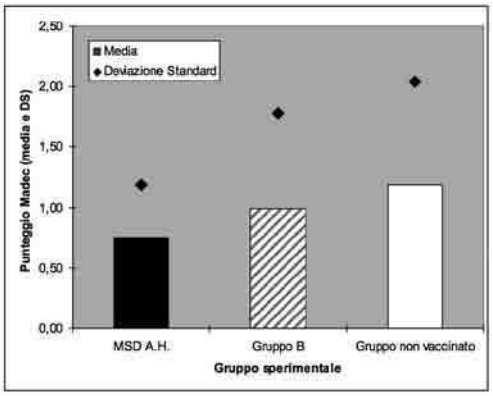


Figura 3: *Punteggi polmonari nei confronti di M.hyopneumoniae (media ± deviazione standard) dei 3 gruppi in prova (studio 1).*
Figure 3: *M.hyopneumoniae lung scores (Mean ± SD) in the 3 trial's groups (study 1).*

Studio 2
Per quanto riguarda le perdite (morti + scarti) ed i trattamenti antibiotici per ognuna delle fasi di accrescimento i dati sono riportati di seguito (figure 4 e 5).

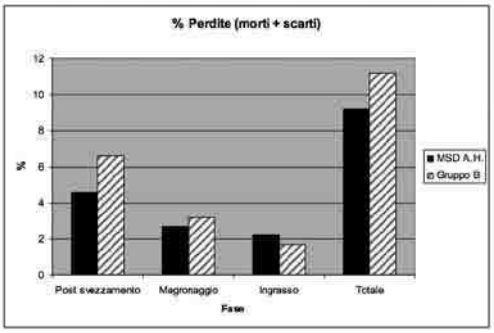


Figura 4: *perdite nei due gruppi in prova (studio 2)*
Figure 4: *losses in the two trial's groups (study 2)*

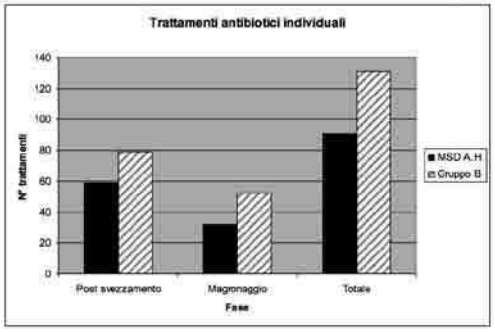


Figura 5: *trattamenti antibiotici individuali (studio 2).*
Figure 5: *antibiotic treatments (nr. of treatments) in the two trial's groups (study 2)*

Complessivamente le perdite sono state 18 su 196 nel gruppo MSD A.H. contro 22 su 196 del gruppo B, e i trattamenti antibiotici iniettabili sono stati 91 su 196 per MSD A.H. contro 131 su 196 del gruppo B. L'elaborazione statistica ha messo quindi in evidenza un rischio maggiore del 11% dei suini del gruppo B di incorrere nell'evento "perdita" e del 33,6% di subire almeno un trattamento antibiotico iniettabile, rispetto ai suini del gruppo MSD A.H.. Tale differenza è risultata significativa per quanto riguarda i trattamenti individuali (tab. 4).

	Risk Ratio	**lower 95% CL**	**upper 95% CL**	**P-value**	**1 – Risk Ratio**
Perdite *(Losses: runts + dead pigs)*					
MSD A.H. / gruppo B	0.88988	0.6221	1.272	0.617	+11.0%
Trattamenti *(Treatments)*					
MSD A.H. / gruppo B	0.6636	0.54487	0.80835	0.0001	+33.6%

Tabella 4: *Analisi dell'inferenza statistica tra i due gruppi in prova – studio 2.*
Table 4: *Inferential analysis between the 2 groups – study 2.*

In sede di macellazione sono stati valutati le lesioni polmonari sia relative a *M.hyopneumoniae* (griglia Madec modificata) sia relative a *A.pleuropneumoniae*.

Gruppo	**Polmoni con lesioni *Myco-like***	**Media ± DS**	**Mediana**	**Polmoni con pleurite**	**Indice APPI**
MSD A.H. (M+PAC™ e Porcilis® PCV)	41,2%	0,61 ± 0,94	0	26,3%	0,37
B (altri vaccini mescolati)	55,3%	1,01 ± 1,32	1	39,4%	0,50

Tabella 5: *Punteggi polmonari vs. M.hyopneumoniae (metodo Madec modificato) e punteggio pleuriti - studio 2.*
Table 5: *Lung scores against M.hyopneumoniae (modified Madec's method) and pleurisy scores (APP index) – study2.*

Relativamente al punteggio polmonare per polmonite enzootica (Griglia Madec) è stata riscontrata una differenza significativa nella media di partita, tra i due gruppi ($p<0,05$).
Anche per quel che riguarda le lesioni pleuriche riferibili a precedenti infezioni da *A. pleuropneumoniae*, il gruppo MSD A.H. ha ottenuto un punteggio polmonare medio di partita e un indice APPI più basso del gruppo B, ma le differenze osservate sono risultate soltanto tendenziali ($p<0,10$),

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il protocollo dello studio 1, prevedendo la misurazione dei titoli anticorpali, ha permesso di riscontrare delle differenze nell'entità della risposta anticorpale umorale, risultata quantitativamente più elevata nei soggetti vaccinati con M+PAC™ e Porcilis® PCV, rispetto ai due vaccini analoghi ed al gruppo controllo.
Nello studio 2 sono state rilevate differenze a livello clinico e sanitario (mortalità totale e numero di soggetti scartati) tra il gruppo vaccinato con M+PAC™ e Porcilis® PCV, rispetto al gruppo vaccinato con un'associazione di due vaccini analoghi (gruppo B); in particolare i soggetti vaccinati con M+PAC™ e Porcilis® PCV hanno richiesto un numero significativamente inferiore di trattamenti antibiotici iniettabili ($p<0,05$). Questo risultato è in linea con quanto osservato, relativamente ai vaccini vs. il PCV2, in studi analoghi condotti in altri Paesi (8), dove la misurazione individuale dei pesi corporei ha permesso di evidenziare, oltre alle differenze nei risultati sanitari, anche delle differenze nelle performance dei vaccini per quanto riguarda gli incrementi ponderali.
Relativamente alla componente *M. hyopneumoniae*, in entrambi gli studi è stata evidenziata un punteggio polmonare medio di partita inferiore nei soggetti vaccinati con M+PAC™. Questa differenza è risultata statisticamente significativa nello studio 2 ($p<0,05$), in cui, inoltre, i suini del gruppo MSD A.H. hanno mostrato anche una minore prevalenza e gravità delle pleuriti croniche.
L'esperienza che è possibile trarre dallo svolgimento di questi studi, in particolare per quanto riguarda la componente PCV2, è che non sempre è possibile riscontrare differenze nei risultati sanitari tra animali vaccinati e non vaccinati, e questo dipende dalla gravità delle infezioni, dalle condizioni ambientali e dal management dell'allevamento e addirittura dall'andamento delle patologie nel lotto in esame. Nello studio 1, infatti, la viremia da PCV2, è risultata tardiva e limitata nel tempo ed ha raggiunto al massimo un valore pari a circa $10^{5,5}$ copie/ml, e questo probabilmente è stato uno dei fattori che non ha permesso di rilevare differenze significative nelle perdite dei 3 gruppi a confronto. Quanto si è verificato potrebbe anche essere dovuto al fatto che la vaccinazione è stata eseguita in due gruppi su 3, e questo avrebbe comunque diminuito la circolazione virale, proteggendo anche i soggetti non vaccinati, che sono stati allevati nei medesimi ambienti di quelli vaccinati.
In conclusione, questo studio ha permesso di evidenziare come i soggetti vaccinati con i vaccini MSD A.H., hanno mostrato dei titoli anticorpali umorali quantitativamente maggiori, un numero di trattamenti antibiotici iniettabili mediamente inferiore e minori lesioni polmonari al macello, in modo statisticamente significativo nel secondo studio.

RINGRAZIAMENTI
Si ringraziano la Dr.ssa Telma Tucci ed il Dr. Gianmaria Veronesi per avere partecipato all'esecuzione di questi studi di campo.

BIBLIOGRAFIA

1. G. Merialdi, M. Dottori, P. Bonilauri, A. Luppi, S. Gozio, P. Pozzi, B. Spaggiari, P. Martelli (2011) *Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors.* The Veterinary Journal, Accepted 9 November 2011.

2. Dottori, M., Nigrelli, A.D., Bonilauri, P., Merialdi, G., Gozio, S., Cominotti, F. (2007*) Proposta per un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione. La griglia SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System)*. Large Animal Review 13, 161–165.

3. Alborali L. (2011) *Profili sierologici e PCR nei confronti di PRRSv e PCV2 nei suini in accrescimento ed ingrasso: dati aggiornati.* Simposio "Approccio integrato nei confronti del PRRSv e del PCV2 e recenti progressi nel controllo dei batteri respiratori", Pozzolengo (BS), 13 settembre 2011. Atti del simposio disponibili presso gli Autori.

4. Dewey C.E., Vilaca K., Reidl M., De Grau F., Richardson K., Poljak Z. (2010) *Why PCV2 viremia matters to swine practitioners.* Proceedings 21st IPVS Symposium, Vancouver: O.250, page 282.

5. Eggen A. (2010) *Impact of PCV2 viraemia: Less virus, more profit.* Pig Progress 26(9): 13-15.

6. Ubeda J.L., Menjon R., Bollo J.M., Jimenez M. (2010) *Comparison of the serology of piglets vaccinated with Porcilis ®PCV and an alternative PCV vaccine.* Proceedings 21st IPVS Symposium, Vancouver: P.095, page 401.

7. Marco E., Bollo J.M., Menjon R., Jimenez M. (2010) *Comparative humoral immunity response to vaccination with Porcilis® PCV, a second commercial vaccine und unvaccinated animals*. Proceedings 21st IPVS Symposium, Vancouver: P.109, page 415.

8. Ubeda J.L., Menjon R., Bollo J.M., Jimenez M., Lopez J.V., Rodriguez J. (2010) *Comparison of the efficacy of Porcilis®PCV and an alternative PCV-vaccine under field conditions.* Proceedings 21st IPVS Symposium, Vancouver: P.092, page 398.

PREMIO GUADAGNINI

VACCINAZIONE CONTRO VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO (PRRSV) E ESPOSIZIONE A INFEZIONE NATURALE DA CEPPO ETEROLOGO DI CAMPO: EFFICIENZA IMMUNITARIA E RISPOSTA NEUROENDOCRINA IN SUINI CONVENZIONALI

VACCINATION AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) AND EXPOSURE TO NATURAL INFECTION BY A HETEROLOGOUS FIELD ISOLATE: IMMUNE EFFICIENCY AND NEUROENDOCRINE RESPONSE IN CONVENTIONAL PIGS

L. FERRARI

Dipartimento di Salute Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma

Parole chiave: virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), vaccinazione, infezione naturale, ceppo eterologo, risposta immunitaria e neuroendocrina.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), vaccination, natural infection, heterologous isolate, immune and neuroendocrine response.

Riassunto

La caratterizzazione della risposta anti-virale riveste una notevole importanza nello studio dei meccanismi volti a contrastare le infezioni e nell'impiego di nuove strategie per il miglioramento dell'efficienza vaccinale e della protezione immunitaria. Anche la determinazione della regolazione neuroendocrina può fornire informazioni sull'evoluzione dell'infezione, in quanto esiste una comunicazione bi-direzionale tra sistema immunitario e assi neuroendocrini. Ormoni quali cortisolo e ormone della crescita possono agire come sostanze immunomodulatrici, influenzando la risposta immunitaria e il decorso della patologia.

Il virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del suino (PRRSV) è una delle principali cause di malattia nel suino e la sua interazione con il sistema immunitario è complessa e ancora scarsamente compresa. Inoltre, ceppi virali geneticamente e antigenicamente distinti aumentano le difficoltà nello sviluppo di vaccini efficaci ad ampio spettro.

Nel presente lavoro, sono state dapprima valutate e ottimizzate differenti tecniche immunologiche e approcci di analisi al fine di quantificare in modo appropriato la risposta anti-virale, con particolare attenzione all'immunità cellulare. Inoltre, l'efficacia della somministrazione intradermica (ID) mediante dispositivo senza ago (IDAL®) è stata valutata rispetto alla più convenzionale somministrazione intramuscolare (IM) in un modello di intensa stimolazione anti-virale [vaccinazione per Aujeszky's Disease Virus (ADV)] allo scopo di trasferire tale applicazione alla più complessa interazione virus-ospite dopo vaccinazione e infezione da PRRSV.

La vaccinazione ID si è dimostrata in grado di indurre un'intensa risposta immunitaria, comparabile alla vaccinazione IM, come immunità umorale (anticorpi virus-neutralizzanti) e cellulare (cellule secernenti IFN-γ). I dati citoflurimetrici hanno evidenziato una modulazione positiva di cellule NK, linfociti T citotossici CD8β+, cellule T attivate

CD4-CD25+ e regolatorie CD4+CD25+ in suini vaccinati per via ID. L'espressione genica di IFN-γ nelle PBMC è risultata indotta in entrambi i gruppi di animali vaccinati. La risposta immunitaria a PRRSV è stata quindi determinata dopo vaccinazione (ceppo cluster Lelystad) e infezione naturale da ceppo eterologo di campo (cluster italiano, 84% omologia ORF5) e associata al grado di protezione crociata e riduzione della patologia. Parallelamente ai parametri immunologici e clinici, è stata anche considerata l'attivazione citochinica e ormonale. Rispetto ai suini controllo, i suini vaccinati (gruppi IM e ID) hanno mostrato una riduzione della sintomatologia respiratoria del 72% e 79% e della sintomatologia complessiva (sintomatologia respiratoria + sintomatologia sistemica) del 68% e 72% rispettivamente. La protezione clinica è risultata associata a un'intensa attivazione immunitaria cellulo-mediata. I livelli più elevati di cellule PRRSV-specifiche secernenti IFN-γ sono stati osservati in associazione a un aumento di cellule NK, linfociti T γ/δ e linfociti T citotossici CD4-CD8+^{high} nel sangue.
La protezione clinica è stata dimostrata dalla riduzione della sintomatologia clinica in termini di incidenza, durata e gravità, e da una più efficiente risposta immunitaria cellulo-mediata. Il precoce e rapido incremento dopo infezione e successivo ritorno a livelli basali dell'espressione di IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1 e IFN-γ nelle PBMC, associato a modificazioni endocrine (cortisolo e GH) temporalmente regolate e più ridotti livelli di IL-10, sostengono una più efficiente responsività di cellule periferiche dell'immunità innata nella fase iniziale dell'infezione e un più efficiente controllo dello stato infiammatorio in una fase successiva. Inoltre, il grado di protezione clinica non è apparso influenzato dalla via di somministrazione del vaccino. I risultati confermano che la capacità di un ceppo di PRRSV di indurre una risposta immunitaria intensa riveste una maggior importanza rispetto alla similarità genetica tra ceppo vaccinale e ceppi di campo al fine di conferire una protezione clinica.

Abstract
The characterization of the anti-viral immune response is particularly relevant with regards to the study of the mechanisms mounted to cope with infections and to the employment of new strategies for improving vaccination efficacy and immune protection. Also determining the neuroendocrine modulation can be informative on the progression of infection since a bi-directional communication exists between the immune system and neuroendocrine axes. Hormones such as cortisol and growth hormone can act as immunomodulatory mediators, thus influencing the immune response and the recovery from the disease.
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is one of the major causes of disease affecting the swine population and its interaction with the immune system is complex and still poorly understood. Moreover, genetically and antigenically divergent strains make the development of efficacious wide spectrum vaccines more difficult.
In the present work, different immunological techniques and approaches of analysis were firstly evaluated and optimized in order to properly measure the anti-viral immune response, with particular attention to cellular immunity. Moreover, the efficacy of vaccine intradermal (ID) administration by a needle-less device (IDAL®) was assessed in comparison with the more conventional intramuscular (IM) route in a model of intense viral immune stimulation [vaccination against Aujeszky's Disease Virus (ADV)] in order to transfer such application to the more complex virus-to-host interaction observed upon PRRSV vaccination and infection.

ID vaccination proved to be able to elicit an intense immune response, strictly comparable to IM vaccination, in terms of humoral (VN antibodies) and cellular (IFN-γ secreting cells) immunity. Flow cytometry showed a positive modulation of NK cells, CD8β+ cytotoxic cells, CD4-CD25+ activated and regulatory CD4+CD25+ T cells in ID-vaccinated animals. IFN-γ gene expression in PBMC of both vaccinated groups was up-regulated.
The immune response to PRRSV was then determined after vaccination (Lelystad cluster strain) and natural infection by a heterologous field strain (Italian cluster, 84% ORF5 homology) and associated with the degree of cross-protection and reduction of disease. Besides immunological and clinical evaluations, also cytokine and hormonal activation were assessed. Compared to controls, vaccinated pigs (IM and ID groups) showed a reduction of the respiratory signs by 72% and 79% and of the overall clinical signs by 68% and 72%, respectively. Clinical protection was associated with a marked cell-mediated immune activation. The highest levels of PRRSV-specific IFN-γ secreting cells were associated with the increase of peripheral NK cells, γ/δ T lymphocytes and cytotoxic CD4-CD8+^{high} T lymphocytes.
Clinical protection was demonstrated by the reduction of clinical signs in terms of incidence, duration and severity, and by a more efficient cell-mediated immune response. The early and prompt increase after PRRSV infection and the subsequent decrease to basal levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1 and IFN-γ gene expression in PBMC, associated with temporally regulated endocrine changes (cortisol and GH) and lower IL-10 expression levels, sustain a more efficient responsiveness of peripheral innate immune cells in the early phase of infection and a more efficient control of inflammation in a later phase. Furthermore, the degree of clinical protection was not affected by the administration route. The results confirm that the ability of a PRRSV strain to induce a strong immune response is more important than the genetic similarity between vaccine and field strain in order to induce clinical protection.

INTRODUZIONE

Nella patogenesi dell'infezione da PRRSV, l'interazione tra il virus e le risposte infiammatorie e immunitarie del suino è complessa; l'immunità verso il virus è spesso solo parzialmente efficace in quanto l'attivazione subottimale o alterata dei meccanismi di difesa innati dovuta a meccanismi virali di evasione causa uno sviluppo ritardato dell'immunità adattativa e induce persistenza virale (Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004).
La risoluzione dell'infezione è invece dipendente da un'efficiente attivazione dei sistemi infiammatori ed innati-adattativi che coinvolgono citochine, volti a inibire la replicazione virale e il mantenimento di cellule infette.
Varie citochine pro-infiammatorie, quali IFN-α/β, IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1, e citochine immunomodulatrici, quali IFN-γ e IL-10, sono coinvolte nella risposta conseguente al riconoscimento virale cosicché una produzione di intensità e durata regolata può stimolare una risposta umorale e cellulare efficace, favorendo l'eliminazione virale (Scheerlinck and Yen, 2005; Thacker, 2005; Corradi et al., 2007). Nel suino, infatti, varie sottopopolazioni immunitarie sono responsabili della secrezione di queste citochine; in particolare, i livelli di cellule secernenti IFN-γ, citochina prodotta da cellule NK, linfociti T γ/δ, linfociti T citotossici, linfociti Th1 e cellule memoria, sono considerati un parametro informativo per il monitoraggio della reattività immunitaria a seguito di vaccinazione ed infezione (Meier et al., 2003, Zuckermann et al., 2007).

Nella valutazione della risposta immunitaria a PRRSV, un altro aspetto che recentemente sta rivestendo sempre maggior interesse è caratterizzato dal fatto che un maggior grado di protezione è stato osservato in condizioni di re-infezione da ceppi omologhi rispetto al ceppo di prima esposizione o rispetto al vaccino utilizzato, soprattutto per quanto riguarda vaccini vivi attenuati (MLV, modified live viruses), mentre esposizione a ceppi considerati eterologhi a livello genetico conferisce una protezione più variabile e generalmente meno intensa (Murtaugh et al., 2002). Il grado di protezione crociata sembra, infatti, essere influenzato dal grado di vicinanza genetica ma anche essere dipendente dalla possibile variabilità antigenica e da fattori non ancora conosciuti sia del virus che della genetica dell'ospite. Sembra comunque che la risposta sia fortemente influenzata dalla capacità di ciascun ceppo virale di stimolare e amplificare una risposta anticorpale neutralizzante ed una risposta cellulare efficace (Labarque et al., 2003, 2004; Diaz et al., 2006, Prieto et al., 2008). Scenari di persistenza virale in presenza di livelli anche elevati di anticorpi neutralizzanti o cellule secernenti IFN-γ o altri meccanismi immunitari testimonia come la immunopatogenesi del virus sia ancora solo parzialmente compresa.
È risaputo che, all'interno sia del prototipo europeo (EU) che americano (AM), esiste un'ampia variabilità genetica, tale da far identificare gruppi virali con caratteristiche conservate (clusters) e singoli isolati con caratteristiche peculiari tali da essere denominati varianti virali. Inoltre possono anche manifestarsi fenomeni di mutazione genica che fanno evolvere il ceppo virale nel tempo (Forsberg et al., 2002; Mateu et al., 2003; Stadejek et al., 2006, 2008).
Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione quando viene valutata la risposta immunitaria a PRRSV consistente nel fatto che, a differenza delle condizioni sperimentali, la valutazione in condizioni di campo può permettere di osservare l'insorgenza e l'evolversi della patologia (PRRS) in modo più esacerbato e quindi valutare in modo più informativo l'efficacia vaccinale in termini di prevenzione e/o riduzione della sintomatologia clinica (Halbur, 2003, Van Gucht et al., 2003; Martelli et al., 2007, 2009).
Sempre maggiori evidenze, sia in campo umano che animale, hanno inoltre evidenziato che esiste un'intensa comunicazione bi-direzionale tra cellule responsabili delle risposte infiammatorie/immunitarie, citochine, e mediatori neuroendocrini; citochine e ormoni quali cortisolo, ormone della crescita (GH), IGF-1 e prolattina, possono infatti essere tra i principali responsabili del potenziamento delle risposte cellulari e umorali, sia locali che sistemiche (Borghetti et al., 2006a, 2006b, 2009).
Scopo del presente studio è stato la valutazione ed ottimizzazione di tecniche ed approcci di analisi per la determinazione qualitativa e quantitativa della risposta immunitaria e neuroendocrina in ambito di vaccinazione e infezione virale nel suino. Tali aspetti sono stati considerati in un modello di intensa stimolazione anti-virale, quale la vaccinazione per virus della malattia di Aujeszky (ADV), e nell'ambito di un'interazione virus-sistema immunitario più complessa, ossia a seguito di vaccinazione ed infezione naturale da PRRSV. Nel primo caso, è stata valutata la capacità di un vaccino somministrato per via intradermica (ID) con dispositivo senza ago di indurre una immunità comparabile con quella indotta dalla via intramuscolare (IM); nel secondo caso, dopo un confronto tra risposta a vaccinazione per ADV e PRRSV (cluster Lelystad), la risposta a PRRSV è stata valutata anche a seguito di esposizione a infezione da ceppo eterologo di PRRSV (cluster italiano) in condizioni di campo in modo da determinare l'efficacia vaccinale in termini di protezione clinica e attivazione/regolazione della risposta immunitaria umorale/cellulare e neuroendocrina.

MATERIALI E METODI

Animali e disegno sperimentale

- Vaccinazione per Virus della Malattia di Aujeszky (ADV)
Suini convenzionali di 60 giorni (n = 30) nati da scrofe vaccinate in un allevamento libero da Malattia di Aujeszky (AD) sono stati distribuiti in 3 gruppi: 1) suini vaccinati per via intramuscolare (IM, n = 10); 2) suini vaccinati per via intradermica (ID, n = 10) con dispositivo senza ago (IDAL®); 3) suini controllo non vaccinati (C, n = 10).
La vaccinazione è avvenuta a 60 e 88 giorni di età con vaccino costituito da virus vivo attenuato gE-/TK- ($10^{5.5}$ $TCID_{50}$ di Porcilis® Begonia – Merck AH) somministrato in adiuvante (Diluvac Forte®, Merck AH; 2 ml per IM, 0.2 ml per ID); gli animali controllo sono stati inoculati con solo adiuvante.
La valutazione della stimolazione immunitaria indotta dal vaccino (anticorpi virus-neutralizzanti, cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche, sottopopolazioni linfocitarie periferiche, espressione genica di IFN-γ in PBMC) è stata effettuata a 0, 2, 4, 5, 6, 7 settimane post-vaccinazione (PV)
- Vaccinazione per virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV)
Suini convenzionali di 28 giorni in un allevamento PRRSV-free, *Mycoplasma hyopneumoniae*-free sono stati suddivisi in 3 sottogruppi: 1) suini vaccinati per via intramuscolare (IM, n = 10); 2) suini vaccinati per via intradermica (ID, n = 10) con dispositivo senza ago (IDAL®); 3) suini di controllo non vaccinati (C, n = 10).
La vaccinazione è avvenuta a 35 giorni di età con vaccino vivo attenuato ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$ di Porcilis® PRRS – Merck AH) somministrato in adiuvante (Diluvac Forte®, Merck AH; 2 ml per IM, 0.2 ml per ID); gli animali controllo sono stati inoculati con solo adiuvante.
La valutazione della stimolazione immunitaria indotta dal vaccino in termini di livelli di cellule secernenti IFN-γ è stata valutata nell'intero gruppo in confronto alla stimolazione dopo vaccinazione per ADV (confronto gruppi IM+ID, n = 20) a 0, 14, 28 e 35 giorni PV.
La risposta in suini convenzionali sottoposti a stesso trattamento vaccinale (IM, ID) e non vaccinati (C) è stata valutata a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni PV in termini di determinazione dei titoli virali, anticorpi anti-PRRSV totali, sottopopolazioni linfocitarie nel sangue e cellule secernenti IFN-γ PRRSV-specifiche.

- Infezione naturale da ceppo eterologo di PRRSV
A 45 giorni PV, il secondo gruppo di animali vaccinati e non vaccinati è stato messo a contatto con 30 suini con anamnesi positiva per infezione da PRRSV e conferma di infezione circolante al momento dell'esposizione in modo da indurre una infezione naturale. Durante il periodo post-esposizione (PE), campioni di sangue sono stati prelevati a 0 (45 giorni PV), 4, 7, 11, 14, 19, 21, 28, e 34 giorni PE. In questo periodo sono state effettuate le stesse indagini del periodo post-vaccinazione e sono stati valutati i livelli di citochine pro-infiammatorie/immunitarie e ormoni immunomodulatori (GH e cortisolo).

Sintomatologia clinica
Nel periodo PE (34 giorni), i suini sono stati monitorati giornalmente per la sintomatologia clinica generale e respiratoria in modo da definire uno score clinico generale (GCS) e uno score clinico respiratorio (RCS).
Il GCS ha incluso temperatura corporea, appetito e livello di coscienza/letargia. Il RCS

ha incluso la patologia respiratoria (tachipnea e dispnea; Samson et al., 2000), tosse e scolo nasale. Uno score clinico complessivo (OCS) è stato calcolato come GCS + RCS. L'efficacia vaccinale è stata determinata secondo Kirkwood e Stern (2003).

Quantificazione di PRRSV e anticorpi anti-ADV e anti-PRRSV

La identificazione di PRRSV è stata effettuata mediante PCR nel siero nel periodo PV e PE. Nel periodo PE, i livelli virali sono stati valutati mediante titolazione su macrofagi alveolari (PAM) secondo Van Reeth et al. (1996) e Labarque et al. (2000). PRRSV isolato da siero e polmoni dei suini manifestanti la patologia nel sito ricevente e nei suini sperimentali nel periodo PE è stato sottoposto a sequenziamento della ORF5 secondo Oleksiewicz et al. (1998).

La identificazione e titolazione (S/P) degli anticorpi anti-ADV e anti-PRRSV è stata effettuata mediante kit ELISA (HerdChek® anti-PRVg1 (gE) e HerdChek® PRRS Antibody Test Kit – IDEXX).

Test di virus neutralizzazione (VNT) per ADV

Il test di virus neutralizzazione per ADV è stato effettuato utilizzando diluizioni seriali (1:2) di siero e sospensione virale ($5x10^3$ $TCID_{50}$/ml). Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, sono state aggiunte cellule VERO e la comparsa dell'effetto citopatico è stata valutata per almeno 4 giorni. I titoli anticorpali sono stati espressi come log_2 del reciproco della più alta diluizione alla quale il virus è stato neutralizzato (100% end-point).

Immunofenotipizzazione e quantificazione delle sottopopolazioni linfocitarie

La caratterizzazione e quantificazione delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico dopo vaccinazione per ADV e dopo vaccinazione per PRRSV (periodo PV) e infezione naturale (periodo PE) è stata effettuata secondo Borghetti et al. (2006). I campioni cellulari sono stati sottoposti a singola o doppia marcatura di superficie per 15 minuti al buio con anticorpi monoclonali ad opportuna concentrazione e successiva eliminazione della componente eritrocitaria mediante lisi per 15 minuti con soluzione NH_4Cl (pH 7.2). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mouse anti-pig-CD3ε-PE (clone PPT3), mouse anti-pig-CD4α-PE (clone 74-12-4), mouse anti-pig-CD8α-FITC (clone 76-2-11 - Southern Biotech), mouse anti-pig-CD8β (clone PG164A), mouse anti-pig-TCRγ/δ (linea PGBL22A - VMRD), goat $F(ab')_2$ anti-mouse IgG-FITC (Dako Cytomation), mouse anti-pig-CD16-FITC (clone G7), mouse anti-pig-CD25 (clone 3B2 - Serotec). I campioni sono stati analizzati mediante citofluorimetro Epics® XL-MCL flow cytometer (Beckman-Coulter).

Livelli di cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche

La frequenza di cellule secernenti (CS) IFN-γ ADV-specifiche e PRRSV-specifiche è stata quantificata mediante tecnica ELISPOT nelle PBMC secondo Meier et al. (2003) con minori modifiche. Le PBMC sono state isolate in gradiente di densità con Histopaque-1077® e seminate in RPMI-1640+10%FBS ($2x10^6$ cellule/ml) in piastre MultiScreen®$_{HTS}$-IP (MSIPS4510 - Millipore) rivestite O/N a 4°C con anticorpo anti-pig-IFN-γ (clone P2G10 – BD) e bloccate con RPMI-1640. La stimolazione antigenica *ex vivo* è stata effettuata per 20 ore, 37°C, 5% CO_2, con ADV (ceppo Begonia) o PRRSV (ceppo DV) utilizzati per la vaccinazione *in vivo*. Le prove di ottimizzazione della tecnica hanno previsto una titolazione in un intervallo di concentrazione compresa tra 0.1 e 1 MOI, mentre la valutazione temporale è stata effettuata con 0.5 MOI di ADV e 0.5-1 MOI di PRRSV. Dopo rimozione delle PBMC, le piastre sono state incubate per 1 ora a 37°C

con anticorpo anti-IFN-γ biotinilato (clone P2C11 – BD) e quindi con anticorpo anti-biotina AP-coniugato (SP3020 – Vector Labs) in PBS+0.5%BSA. La rivelazione è stata effettuata con 1/100 BCIP/NBT per 7 minuti al buio. La frequenza di cellule secernenti IFN-γ è stata quantificata con lettore ELISPOT AID® e rapportata a 10^6 PBMC.
La responsività cellulare a ADV e PRRSV è stata anche valutata mediante l'identificazione di "categorie di responsività" sulla base delle risposte osservate e secondo Xiao et al. (2004). La risposta a PRRSV è stata inoltre quantificata come animali "responsivi" e "non responsivi" dopo definizione di un valore ottimale di cut-off di 30 CS IFN-γ/10^6 PBMC.

Quantificazione dell'espressione genica di citochine
I livelli di espressione genica di IFN-γ nelle PBMC dopo vaccinazione per ADV sono stati determinati mediante PCR quantitativa. I livelli delle citochine pro-infiammatorie (IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1) ed immunitarie (IFN-γ, IL-10) nelle PBMC dopo vaccinazione e infezione naturale da PRRSV sono stati determinati mediante PCR.
In entrambi i casi, dopo isolamento delle PBMC con Histopaque-1077®, l'RNA totale è stato estratto mediante TRI-Reagent e la concentrazione determinata con spettrofotometro (GeneQuant pro[a], Amersham). L'RNA è stato retrotrascritto con kit Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (Amersham) e primer oligo dT (Ambion).
La PCR real-time per IFN-γ è stata effettuata usando termociclatore Rotor-Gene 3000™ (Corbett Research) con Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG e specifici primer (0.5 μM). Il profilo termico ha previsto uno step a 50°C per 2 min., a 95°C per 2 min. e quindi 45 cicli di amplificazione (95°C 15 sec., 58°C 30 sec., 72°C 30 sec.).
I risultati sono stati analizzati con metodo della curva standard relativa (Bustin, 2000) utilizzando il gene GAPDH come riferimento (Fisher et al., 2006). La PCR per le citochine pro-infiammatorie/immunitarie è stata effettuata per 27 cicli (94°C 1 min., T_a primer 1 min., 72°C 1 min.). I prodotti di amplificazione sono stati valutati su gel di agarosio con SYBR® Safe (Invitrogen) ed analizzati con programma Scion Image. Il gene per l'RNA ribosomiale 18S è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione.

Livelli di GH e cortisolo
I livelli plasmatici di GH e cortisolo sono stati quantificati mediante ELISA (Baratta et al., 2002) e RIA (Tamanini et al., 1983), rispettivamente. L'ELISA ha previsto un'incubazione dei campioni e standard con anticorpo anti-pig-GH (1/300,000) per 48 ore a 4°C. È stato quindi aggiunto anticorpo anti-pig-GH biotinilato per 2 ore a 4°C e poi extravidina POD-coniugata (1/2,000) per 1 ora. La reazione è stata rivelata dopo incubazione per 25 min. con ABTS/H_2O_2 mediante lettura dell'assorbanza a 405 nm (Spectra Shell Microplate Reader). Il RIA ha previsto l'utilizzo di cortisolo H_3-marcato e anticorpo anti-pig-cortisolo. La lettura è stata effettuata con lettore per radiazioni beta.

Analisi statistica

Vaccinazione per ADV. I dati sono stati sottoposti a analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute utilizzando un modello lineare misto. I valori pre-vaccinazione sono stati inclusi come covariata. Le correlazioni tra i parametri sono state valutate con coefficiente di Pearson. Il livello di significatività è stato definito per $p<0.05$. L'analisi è stata effettuata mediante programma SAS (v. 9.1).

Vaccinazione-infezione naturale da PRRSV. L'analisi di confronto dei gruppi sperimentali in relazione alla stintomatologia clinica (GCS e RCS) è stata effettuata con test del χ^2 e test di Dunnett. L'efficacia vaccinale è stata quantificata come proporzione di casi di patologia prevenuti e rischio di malattia tra suini vaccinati e non vaccinati esposti a infezione naturale (Kirkwood and Sterne, 2003).
La ANOVA è stata usata per valutare differenze nei titoli virali e per i cambiamenti temporali delle cellule secernenti IFN-γ in ELISPOT. L'analisi dopo definizione di cut-off ottimale (30 CS IFN-γ/10^6 PBMC), con relativi valori di specificità (Sp) e sensibilità (Se), identificato mediante curve ROC, ha previsto la valutazione di dati binari (positivo-negativo) con test di Fisher.
Il confronto tra gruppi e nel tempo per i livelli di citochine ed ormoni è stato effettuato con ANOVA e test di Dunnett. Valori di $p<0.05$ sono stati considerati significativi. L'analisi è stata effettuata con programma SPSS (v.14.0)

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vaccinazione per ADV e confronto con vaccinazione per PRRSV

Il presente lavoro ha previsto lo sviluppo e ottimizzazione di tecniche immunologiche per la determinazione della reattività e modulazione di cellule e mediatori immunitari al fine di sfruttare tali approcci e parametri per lo studio di aspetti immunologici e virologici, oltre che clinici, alla base della efficacia vaccinale e protezione crociata a seguito di infezione da ceppo eterologo di PRRSV rispetto al ceppo utilizzato come vaccino.
A tal fine sono state dapprima indagate tecniche immunologiche per la valutazione della risposta immunitaria in un classico modello di intensa stimolazione anti-virale quale la vaccinazione per ADV in quanto noto essere caratterizzato da una intensa risposta Th1 (Gerdts, 1997; van Rooij et al., 2004). Inoltre è stata anche valutata la capacità di un sistema di somministrazione vaccinale intradermica (ID) senza ago in confronto alla convenzionale via intramuscolare (IM) in quanto potenzialmente in grado di indurre una stimolazione locale e sistemica più intensa (Mikulska-Skupien et al., 2005; Zhao et al., 2006; Goubier et al., 2008). A fianco della risposta umorale come anticorpi totali virus-specifici e neutralizzanti, particolare enfasi è stata indirizzata alla attivazione cellulare, spesso responsabile della completa eliminazione del patogeno e delle cellule infette (Meier et al., 2003; Mateu et al., 2003; Mateu and Diaz, 2008).

Lo studio relativo alla vaccinazione per ADV ha mostrato che parallelamente all'incremento dei livelli di anticorpi anti-ADV neutralizzanti, è stata indotta e sostenuta una intensa risposta cellulo-mediata come frequenza di cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche dopo entrambe le somministrazioni vaccinali (Fig. 1). La risposta cellulare in ELISPOT è stata valutata anche mediante l'identificazione di "categorie di responsività" per evidenziare possibili distribuzioni all'interno di una stessa tendenza. Dopo vaccinazione per ADV, la stimolazione *ex vivo* ha evidenziato animali altamente responsivi per tutto il periodo di indagine (4 categorie: 100-300, 305-600, 605-1000, 1005-2000 CS IFN-γ/10^6 PBMC) ed i profili medi e la distribuzione in classi tra gruppi IM e ID a ciascun tempo è risultata sovrapponibile (Fig. 2).
È stata anche valutata la "produttività di IFN-γ per cellula" che fornisce informazioni sull'attività secretiva della popolazione cellulare. Il mantenimento di un'elevata secrezione di IFN-γ nel tempo, caratterizzata da spot di grandi dimensioni, testimonia una intensa e duratura capacità di rispondere al richiamo antigenico virale, probabilmente dovuta ad un'ottimale risposta primaria e ad una risposta di cellule T memoria (Fig. 2).

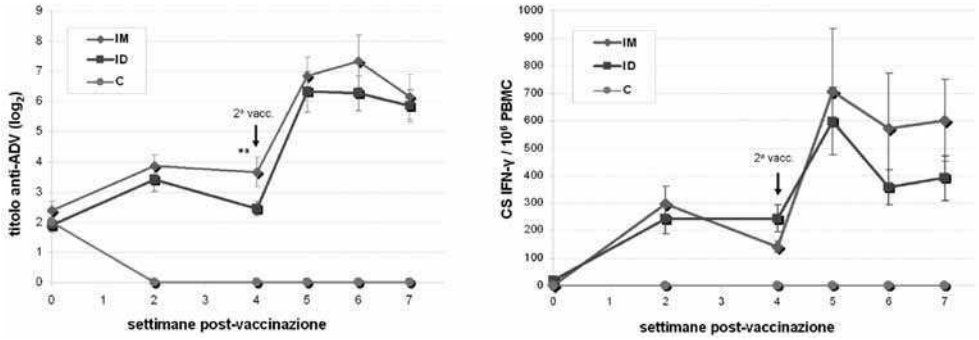


Fig. 1: Risposta umorale (anticorpi anti-ADV neutralizzanti) e risposta cellulo-mediata (cellule secernenti IFN-γ ADV-specifiche) in suini vaccinati per via intramuscolare, intradermica senza ago e in suini controllo.

Fig. 1*: Humoral (anti-ADV neutralizing antibodies) and cell-mediated (ADV-specific IFN-γ secreting cells) immune response in pigs IM- and needle-less ID-vaccinated and in control pigs.*

Categorie di responsività (IM) (CS IFN-γ /10⁶ PBMC)	0	2	4	5	6	7	settimane PV
100-300	0/10	5/10	10/10	4/10	4/10	2/10	
305-600	0/10	4/10	0/10	3/10	3/10	5/10	
605-1000	0/10	1/10	0/10	3/10	0/10	0/10	
1005-2000	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10	

Categorie di responsività (ID) (CS IFN-γ /10⁶ PBMC)	0	2	4	5	6	7	settimane PV
100-300	0/10	8/10	7/10	3/10	5/10	4/10	
305-600	0/10	1/10	3/10	3/10	4/10	2/10	
605-1000	0/10	1/10	0/10	3/10	1/10	4/10	
1005-2000	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	

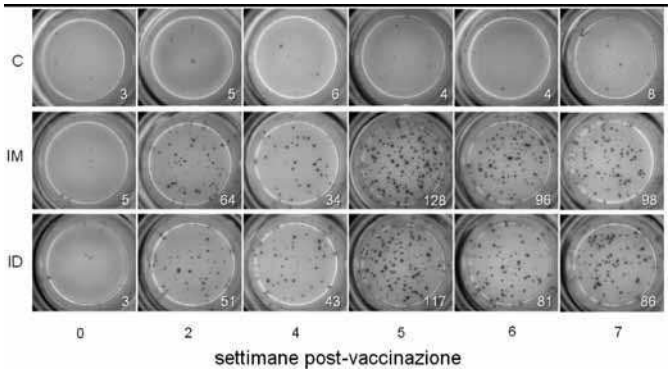


Fig. 2: Categorie di responsività di IFN-γ e produttività per cellula in suini vaccinati IM e ID per ADV.

Fig. 2*: IFN-γ responsiveness categories and IFN-γ per cell productivity in pigs IM- and ID-vaccinated against ADV.*

Il confronto tra la stimolazione *ex vivo* con ADV e PRRSV ha confermato questa osservazione. ADV induce una elevata produzione di IFN-γ per singola cellula (spot grandi) mentre PRRSV ne induce una quantità più ridotta (spot più piccoli); inoltre la risposta ai due virus ha mostrato andamenti contrari, suggerendo la prevalenza dell'effetto citopatico di ADV all'aumentare della concentrazione virale (Fig. 3).

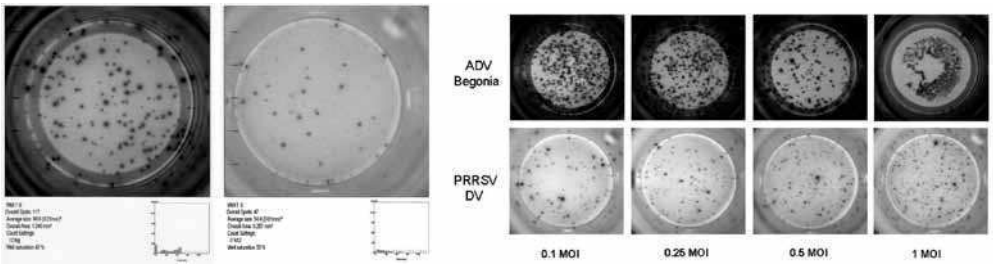


Fig. 3: Confronto tra la produttività di IFN-γ per cellula a seguito di ri-stimolazione *ex vivo* con ADV e PRRSV.
Fig. 3*: Comparison between the IFN-γ per cell productivity upon ex vivo re-stimulation with ADV and PRRSV.*

La risposta post-vaccinale delle cellule secernenti IFN-γ specifiche per ADV e PRRSV ha evidenziato come PRRSV stimoli livelli di cellule secernenti IFN-γ inferiori. Questo fornisce l'indicazione di una minor stimolazione *in vivo* della risposta cellulare per PRRSV, caratterizzata da una maggior frazione di cellule a bassa secrezione di IFN-γ, probabilmente costituita anche da cellule a reattività innata (cellule NK e linfociti T γ/δ) o cellule T scarsamente attivate (Fig. 4). L'ELISPOT si è comunque dimostrato una tecnica altamente sensibile e robusta sia a seguito di intensa (ADV) che debole (PRRSV) re-stimolazione *ex vivo*.

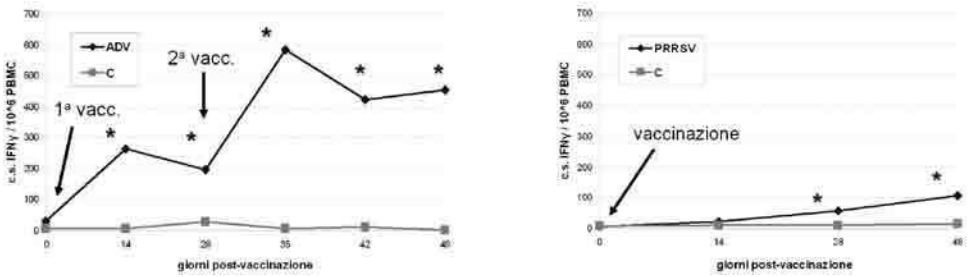


Fig. 4: Confronto tra i livelli di cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche a seguito di vaccinazione per ADV e PRRSV.
Fig. 4*: Comparison of the levels of virus-specific IFN-γ secreting cells after vaccination against ADV and PRRSV.*

Questo è apparso particolarmente evidente quando la risposta a PRRSV è stata analizzata come classi di responsività negli animali vaccinati (IM e ID) considerati come unico

gruppo. Dopo vaccinazione per PRRSV, si sono rilevati ridotte frequenze di CS IFN-γ, tali che vari animali sono stati classificati come a responsività assente-scarsa (0-30 CS IFN-γ). La maggior parte degli animali è risultata con responsività inferiore a 100 CS IFN-γ (tre categorie: 0-30, 35-50, 55-100 CS), mentre solo un ristretto numero ha mostrato valori più elevati (Tab. 1).

CATEGORIE (0.5 MOI)	ADV					
giorni PV	0	14	28	35	42	49
100-300	0/20	14/20	17/20	8/20	11/20	8/20
305-600	0/20	4/20	3/20	6/20	6/20	6/20
605-1000	0/20	2/20	0/20	3/20	1/20	4/20
1005-2000	0/20	0/20	0/20	3/20	2/20	2/20

CATEGORIE (0.5 MOI)	PRRSV			
giorni PV	0	14	28	49
0-30 (*scarsa-assente*)	20/20	14/20	6/20	4/20
35-50 (*bassa*)	0/20	4/20	4/20	0/20
55-100 (*intermedia*)	0/20	1/20	7/20	9/20
>105 (*alta*)	0/20	1/20	3/20	7/20

Tab. 1: Categorie di responsività di IFN-γ in suini vaccinati per ADV e PRRSV (gruppo unico IM + ID).
Tab. 1*: IFN-γ responsiveness categories in pigs vaccinated against ADV and PRRSV (whole group IM + ID).*

Tale analisi può dimostrarsi particolarmente informativa quando risposte alquanto ridotte sfavoriscono la possibilità di evidenziare una differente reattività cellulare. La risposta è stata valutata negli animali vaccinati considerati come unico gruppo in quanto le risposte a seguito di vaccinazione IM e ID sono apparse comparabili, soprattutto per ADV. È apparso inoltre evidente che la risposta alla vaccinazione per PRRSV è fortemente variabile.
L'analisi citofluorimetrica dopo vaccinazione per ADV ha permesso di identificare e monitorare varie sottopopolazioni linfocitarie, con particolare attenzione alle cellule citotossiche (CD8+) e cellule attivate (CD25+). Differenze sono state infatti riscontrate nei livelli delle cellule NK (CD3-CD8α+ e CD16) e dei linfociti T citotossici (CD8β+) tra animali vaccinati e non vaccinati sia dopo prima che seconda somministrazione (Fig. 5, 6a, 6b).

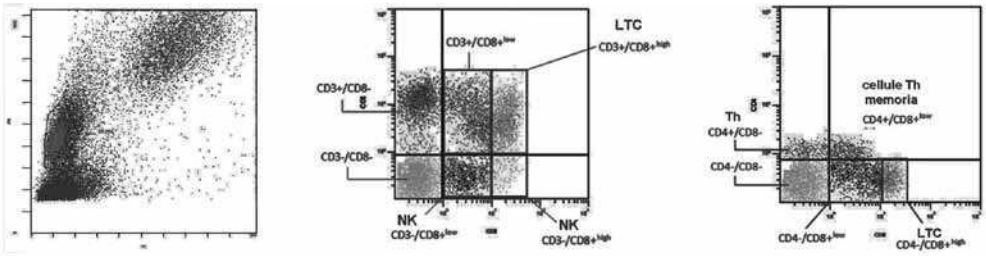


Fig. 5: Identificazione mediante citofluorimetria a flusso delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico.
Fig. 5*: Identification of the lymphocyte subsets in the peripheral blood by using flow cytometry.*

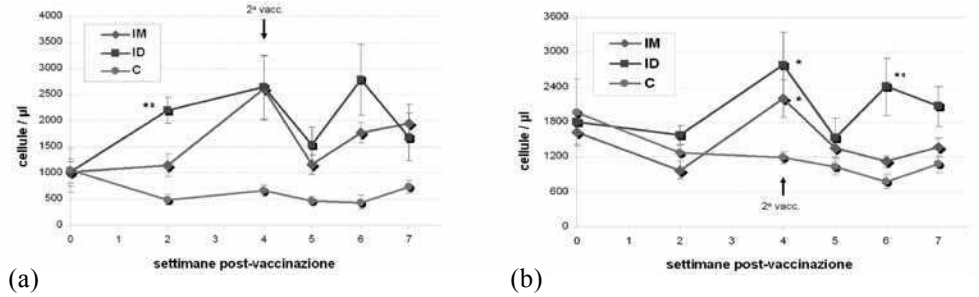


Fig. 6: Livelli di cellule NK CD3-CD8+ (a) e linfociti T citotossici CD8β+ (b) periferici in suini vaccinati e non vaccinati per ADV.
Fig. 6*: Levels of peripheral NK cells CD3-CD8+ (a) and cytotoxic T lymphocytes CD8β+ (b) in ADV-vaccinated and unvaccinated pigs.*

L'aumento transitorio di cellule CD4-CD25+ negli animali vaccinati rispetto agli animali controllo (Fig. 7a) insieme all'incremento delle cellule CD8β+ suggerisce uno stato di attivazione di quest'ultime cellule citotossiche mentre l'incremento transitorio delle cellule CD4+CD25+ (T_{reg}) dopo il richiamo vaccinale sostiene una regolazione positiva dell'attivazione immunitaria (Fig. 7b). La frazione di cellule memoria T helper CD4+CD8+ non ha subito variazioni significative negli animali vaccinati (dati non mostrati); questo risultato può essere stato influenzato dalla maggiore variabilità e dai più ridotti livelli di tale sottopopolazione.

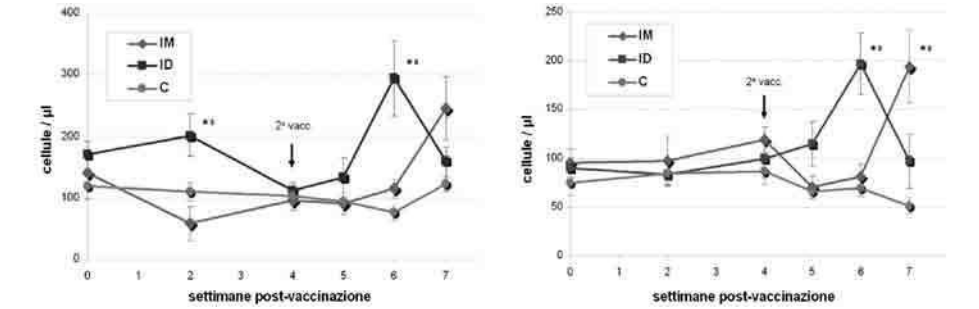


Fig. 7: Livelli di cellule attivate CD4-CD25+ (a) e linfociti T regolatori CD4+CD25+ (b) periferici in suini vaccinati e non vaccinati per ADV.
Fig. 7*: Levels of peripheral activated CD4-CD25+ (a) and CD4+CD25+ regulatory (b) T lymphocytes in ADV-vaccinated and unvaccinated pigs.*

I profili citofluorimetrici hanno fornito informazioni funzionali sulla ripartizione delle cellule immunitarie coinvolte nella risposta anti-virale nonostante le sottopopolazioni responsabili della secrezione di IFN-γ non siano risultate modulate come i livelli di cellule secernenti IFN-γ osservate in ELISPOT. L'espressione genica di IFN-γ nelle PBMC ha mostrato uno stato di attivazione negli animali vaccinati IM e ID rispetto agli animali controllo (Fig. 8).

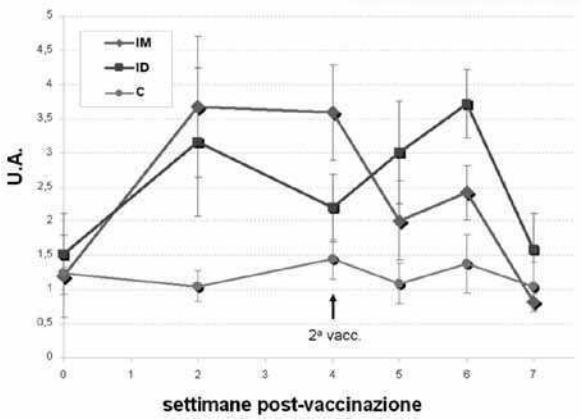


Fig. 8: Livelli di espressione genica di IFN-γ nelle PBMC di suini vaccinati contro ADV per via IM e ID e in suini non vaccinati.
Fig. 8*: Levels of IFN-γ gene expression in PBMC of pigs IM- and ID-vaccinated against ADV and in unvaccinated pigs.*

Vaccinazione per PRRSV e infezione naturale da ceppo eterologo
Lo studio è stato finalizzato alla valutazione della efficacia della vaccinazione per PRRSV, somministrata per via IM e ID in animali successivamente esposti a infezione naturale da ceppo eterologo rispetto al vaccino, in termini di grado di protezione crociata e riduzione della patologia (PRRS) in relazione a modificazioni immunologiche e neuroendocrine. Le condizioni di campo, e quindi l'esposizione naturale, hanno permesso di riprodurre la patologia con sintomatologia clinica evidente e quindi registrare i sintomi e valutare la protezione clinica indotta dal vaccino in modo ottimale. I suini vaccinati hanno mostrato una significativa riduzione sia della sintomatologia generale (GCS) che respiratoria (RCS) dopo infezione, tale che lo score complessivo (OCS) legato alla protezione clinica ha evidenziato una efficacia vaccinale di circa il 70% (Fig. 9). Tale risultato conferma che la similarità genetica tra ceppi di PRRSV non è un buon indicatore del grado di protezione immunitaria (Prieto et al., 2008), considerando ceppo vaccinale e isolato responsabile dell'infezione.

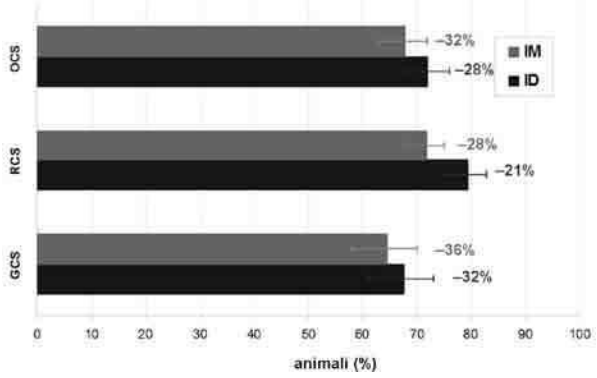
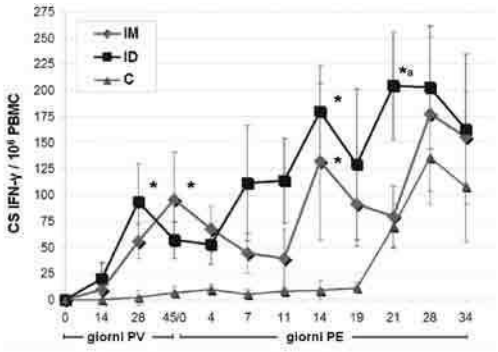


Fig. 9: Efficacia vaccinale in termini di riduzione della sintomatologia clinica come score clinico generale (GCS), respiratorio (RCS) e complessivo (OCS).
Fig. 9*: Vaccine efficacy in terms of reduction of clinical signs as general clinical score (GCS), respiratory clinical score (RCS) and overall clinical score (OCS).*

Seppur si siano evidenziate differenze significative tra numero di animali PRRSV-positivi solo dopo 28-34 giorni PE e non si sia siano osservate differenze nei livelli di viremia tra animali vaccinati e non vaccinati esposti, la reattività umorale e cellulo-mediata ha fornito profili differenti tra i gruppi.
Una rapida risposta anticorpale (S/P) anamnestica è stata osservata dopo esposizione negli animali vaccinati e i livelli di CS IFN-γ PRRSV-specifiche stimolati dalla vaccinazione sono aumentati di 2-3 volte a seguito dell'esposizione/infezione eterologa (Fig. 10a). La risposta delle CS IFN-γ è stata valutata, oltre che come frequenza nelle PBMC, anche come categorie di responsività: questa tipologia di analisi ha evidenziato la comparsa di una risposta significativa dopo vaccinazione in entrambi i gruppi IM e ID, sebbene i livelli siano stati relativamente bassi. Una variabilità elevata di risposta è stata osservata sia dopo vaccinazione che dopo esposizione/infezione; questo testimonia che il riconoscimento virale e l'attivazione immunitaria sono complessi e vari fattori possono influenzarli.
Questo aspetto è confermato dalla reattività post-esposizione negli animali non vaccinati, aumentata solo dopo circa 3 settimane dall'esposizione. L'analisi in categorie ha evidenziato che, come dopo vaccinazione, nelle prime 2-3 settimane PE la risposta negli animali vaccinati si è distribuita in 3 classi (0-30, 35-50, 55-100 CS IFN-γ), anche includendo animali a scarsa-assente o bassa responsività, mentre risposte molto più intense sono state osservate nelle ultime 2 settimane PE (Fig. 10b).



a)

	IM	ID	C
Giorni POST-VACCINAZIONE			
0	0/10	0/10	0/10
14	**3/10**	**4/10**	0/10
28	**8/10***	**9/10***	0/10
45 = 0 PE	**9/10***	**7/10***	0/10
Giorni POST-ESPOSIZIONE			
4	**7/10**	**7/10**	3/10
7	**6/10***	**7/10***	0/10
11	**3/10**	**9/10***	2/10
14	**9/10***	**10/10***	2/10
19	**5/10***	**6/10***	0/10
21	**7/10**	**10/10**	**7/10**
28	**7/10**	**9/10**	**9/9**
34	**7/9**	**7/10**	**5/8**

c)

Categorie di responsività (ID) (CS IFN-γ /10⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (*scarsa-assente*)	3/10	3/10	1/10	0/10	4/10	0/10	1/10	3/10	
35-50 (*bassa*)	3/10	2/10	2/10	2/10	2/10	1/10	0/10	1/10	
55-100 (*intermedia*)	2/10	4/10	4/10	3/10	0/10	1/10	0/10	2/10	
>105 (*alta*)	2/10	1/10	3/10	5/10	4/10	8/10	9/10	4/10	

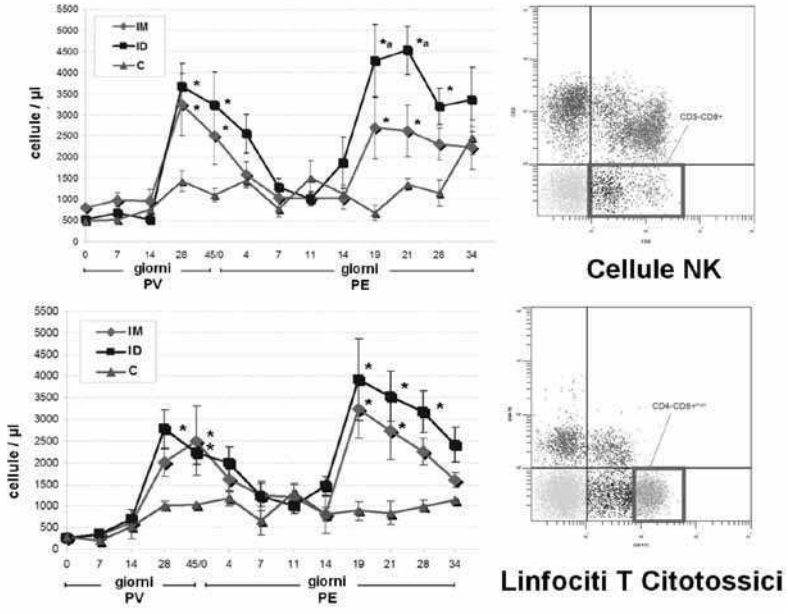
Categorie di responsività (IM) (CS IFN-γ /10⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (*scarsa-assente*)	3/10	4/10	7/10	1/10	5/10	3/10	3/10	2/9	
35-50 (*bassa*)	2/10	2/10	0/10	3/10	0/10	1/10	0/10	0/9	
55-100 (*intermedia*)	3/10	3/10	1/10	3/10	2/10	2/10	3/10	2/9	
>105 (*alta*)	2/10	1/10	2/10	3/10	3/10	4/10	4/10	5/9	

Categorie di responsività (C) (CS IFN-γ /10⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (*scarsa-assente*)	7/10	10/10	8/10	8/10	10/10	3/10	0/9	3/8	
35-50 (*bassa*)	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/9	0/8	
55-100 (*intermedia*)	0/10	0/10	2/10	2/10	0/10	4/10	3/9	2/8	
>105 (*alta*)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	5/9	3/8	

b)

Fig. 10: Risposta di cellule secernenti (CS) IFN-γ PRRSV-specifiche in suini vaccinati e non vaccinati esposti a infezione da ceppo eterologo. Analisi a) come frequenze, b) mediante identificazione di "categorie di responsività" e c) dopo definizione di un valore ottimale di cut-off (30 CS IFN-γ/10^6 PBMC).
Fig. 10*: PRRSV-specific IFN-γ secreting cell (SC) response in vaccinated and unvaccinated pigs exposed to infection by a heterologous isolate. Analysis a) as frequencies, b) by identification of "responsiveness categories" and c) upon definition of an optimal cut-off value (30 SC IFN-γ/10^6 PBMC).*

Data l'elevata sensibilità della tecnica ELISPOT, anche risposte molto ridotte sono state evidenziate (categoria a scarsa-assente responsività: 0-30 CS IFN-γ/10^6 PBMC); l'effettiva efficacia *in vivo* di reattività ridotte può essere questionabile. Per questo, l'analisi della risposta cellulo-mediata è stata affrontata anche determinando un cut-off ottimale, risultato uguale a 30 CS (Sp: 98%, Se: 64%), sulla base del quale i suini sono stati suddivisi in animali "responsivi" e "non responsivi". Con tale analisi, differenze significative di risposta in animali vaccinati sono state osservate già a 14 giorni PV e 7 giorni PE rispetto ai suini controllo, per cui la definizione di un cut-off si è dimostrata efficace per distinguere risposte differenti a seconda del trattamento. Le risposte tra animali vaccinati e controllo sono risultate sovrapponibili anche con questo approccio da 21 giorni PE (Fig. 10c).



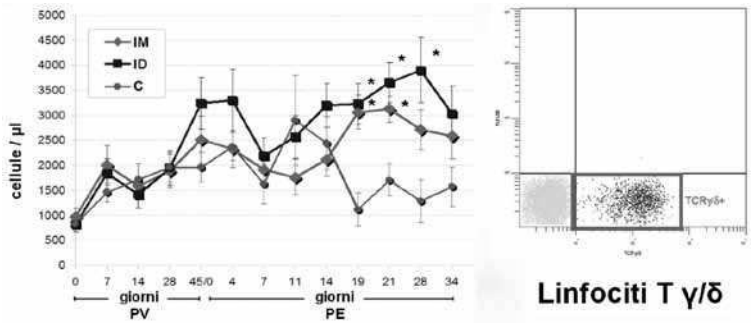


Fig. 11: Livelli di cellule citotossiche nel sangue di suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.
Fig. 11*: Levels of cytotoxic cells in the blood of pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.*

I profili delle CS IFN-γ sono risultati associati sia dopo vaccinazione che infezione a incrementi significativi delle sottopopolazioni responsabili della sua secrezione quali cellule NK (CD3-CD8α+), linfociti T citotossici (CD4-CD8α+^{high}) e linfociti T γ/δ (TCRγ/δ+) (Fig. 11).
La valutazione della reattività cellulare mediante ELISPOT e citofluorimetria ha permesso di evidenziare il coinvolgimento dell'immunità cellulare innata e adattativa nella protezione crociata tra ceppo vaccinale e ceppo di campo. La sintomatologia clinica è risultata fortemente associata alla risposta cellulo-mediata, sia come CS IFN-γ che come sottopopolazioni linfocitarie nel sangue.
Riguardo alla risposta citochinica nelle PBMC come espressione genica, si è osservata una responsività precoce pro-infiammatoria legata a incrementi dei livelli di IL-1β, IL-6, TNF-α e MCP-1 sia negli animali IM che ID esposti a infezione; questo testimonia un efficiente riconoscimento e una maggior efficienza della risposta infiammatoria e immunitaria innata. I livelli di IFN-γ confermano, insieme ai profili ELIPOT, che i suini vaccinati hanno reagito all'infezione con un aumento dell'espressione e secrezione della citochine immunitaria, mantenendo la reattività a seguito di ri-stimolazione virale (Fig. 12).

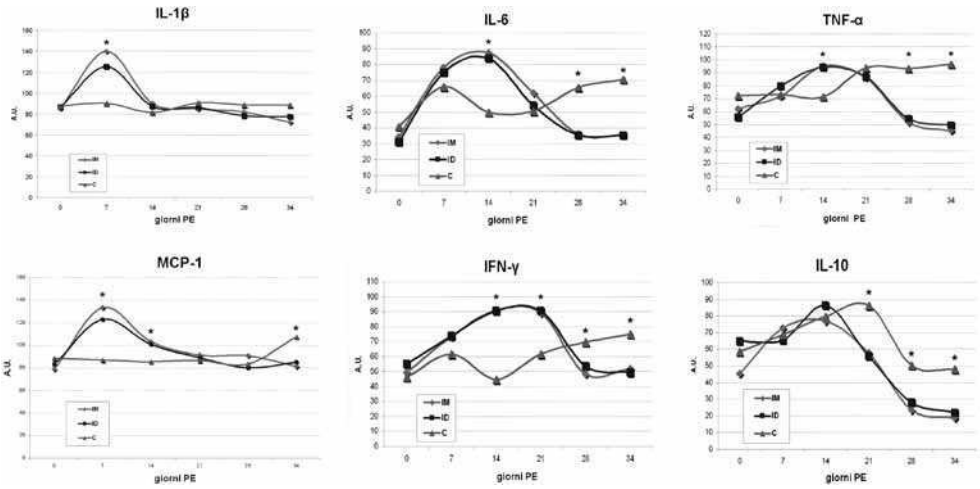


Fig. 12: Livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie e immuni in PBMC di suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.
Fig. 12*: Levels of pro-inflammatory and immune cytokine gene expression in PBMC of pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.*

Considerando i livelli ormonali, i livelli plasmatici di GH sono stati positivamente modulati negli animali vaccinati nelle prime due settimane PE, mostrando quindi una regolazione a sostegno della risposta infiammatoria immunitaria innata (Fig. 13). Il mantenimento di livelli superiori di IL-10 negli animali non vaccinati-esposti/infetti a tempi più tardivi si è associato ad una reattività ritardata (IL-6, TNF-α, MCP-1, IFN-γ) o assente (IL-1β). Livelli superiori di citochine pro-infiammatorie e IL-10 nella fase più avanzata dell'infezione (dopo circa 1 mese) possono essere interpretati come uno stato non controllato di infiammazione, controbilanciato dall'azione della IL-10, associato alla patologia (Fig. 12).
I livelli di cortisolo si sono modificati in senso negativo nelle prime due settimane PE solo nei suini non vaccinati sottoposti a infezione in parallelo all'assenza di variazioni significative di GH e reazione infiammatoria precoce. Questa deregolazione neuroendocrina si è associata a sintomatologia (GSC e RSC) più grave e 100% di viremia durante le ultime 2 settimane PE (Fig. 13).

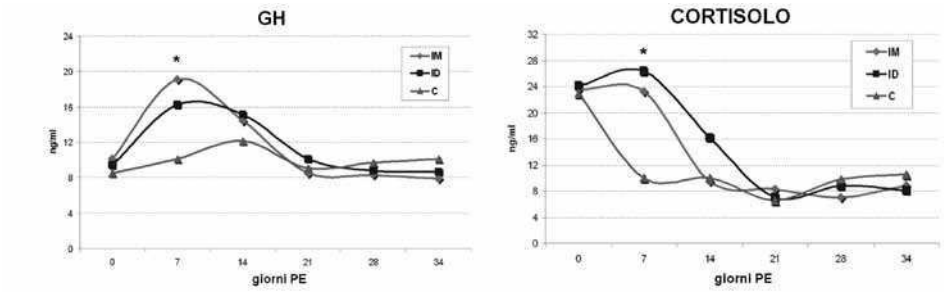


Fig. 13: Livelli plasmatici di ormone della crescita (GH) e cortisolo in suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.
Fig. 13*: Plasmatic levels of growth hormone (GH) and cortisol in pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.*

CONCLUSIONI

Lo studio relativo alla vaccinazione per ADV ha dimostrato che la doppia somministrazione del vaccino per via intradermica (ID) con dispositivo senza ago (IDAL®) è in grado di stimolare una risposta immunitaria comparabile a quella stimolata mediante somministrazione intramuscolare (IM) in termini di immunità umorale (anticorpi virus-neutralizzanti) e cellulo-mediata (cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche).
La vaccinazione ID è apparsa in grado di stimolare una modulazione immunitaria più intesa

e regolata caratterizzata da un incremento più precoce di cellule citotossiche attivate e un più precoce coinvolgimento auto-limitato di linfociti T regolatori.

Lo studio relativo alla vaccinazione per PRRSV e alla infezione naturale sostenuta da ceppo eterologo ha dimostrato che una protezione clinica crociata elevata, sebbene non totale, è stata indotta nei suini vaccinati con virus vaccinale vivo attenuato e che l'efficacia vaccinale è associata a una risposta cellulo-mediata efficiente, in grado inoltre di svolgere un ruolo nella riduzione della gravità della patologia.

La protezione clinica è apparsa associata ad una risposta precoce e regolata di citochine pro-infiammatorie e immunitarie. Al contrario, negli animali non vaccinati, la gravità della patologia e l'infezione sono risultate associate a una risposta cellulare e citochinica assente o ritardata.

Lo studio conferma che la capacità di un ceppo di PRRSV di indurre una risposta immunitaria intensa riveste un ruolo più importante della omologia genetica tra ceppo vaccinale e infettante al fine della protezione clinica.

La somministrazione del vaccino per via intradermica con dispositivo senza ago si è mostrata efficiente quanto la via intramuscolare, oltre che in condizioni sperimentali (Martelli et al., 2007), anche in condizioni di campo, aspetto importante nello sviluppo di applicazioni senza ago per la salute e benessere animale.

References

Baratta M., Saleri R., Mainardi G.L., Valle D., Giustina A., Tamanini C., 2002. Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. Endocrinol. 143, 551-557.

Borghetti P., De Angelis E., Saleri R., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Mocchegiani E., Martelli P., 2006a. Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. Vet. Immunol. Immunopathol. 110, 17-25.

Borghetti P., Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Saleri R., Corradi A., Martelli P., 2006b. Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets. Vet. Res. Comm. 30, 227-230.

Borghetti P., Saleri R., Mocchegiani E., Corradi A., Martelli P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. Vet. Immunol. Immunopathol. 130, 141-162.

Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193.

Corradi A., Ferrari L., Borghetti P., 2007. Parameters for evaluating the cell-mediated immune response during viral infection: diagnostic and prognostic applications. Vet. Res. Comm. 31, 103-107.

Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E., 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. Virol. 351, 249-259.

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.

Forsberg R., Storgaard T., Nielsen H.S., Oleksiewicz M.B., Cordioli P., Sala G., et al., 2002. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewedwithin Europe. Virology. 299, 38-47.

Gerdts V., Jöns A., Makoschey B., Visser N., Mettenleiter T.C., 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. J. Gen. Virol. 78, 2139-2146.

Goubier A., Fuhrmann L., Forest L., Cachet N., Evrad-Blanchard M., Juillard V., Fischer L., 2008. Superiority of needle-free transdermal plasmid delivery for the induction of antigen-specific IFNγ T cell responses in the dog. Vaccine. 26, 2186-2190.

Halbur P., 2003. Factors that influence the severity of clinical disease. In: Zimmerman J. and Yoon K.J. PRRS Compendium. 2nd ed. National Pork Board. 17-26.

Kirkwood B.R. and Sterne J.A.C., 2003. Medical statistics. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science. 454-455.

Labarque G.G., Nauwynck H.J., Van Reeth K., Pensaert M.B., 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J. Gen. Virol. 81, 1327-1334.

Labarque G.G., Van Gucht S., Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M., 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. Vet. Microbiol. 95, 187-197.

Labarque G.G., Van Reeth K., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M., 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. Vaccine. 22, 4183-4190.

Martelli P., Cordioli P., Alborali L.G., Gozio S., De Angelis E., Ferrari L., Lombardi G., Borghetti P., 2007. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. Vaccine. 25, 3400-3408.

Martelli P., Gozio S., Ferrari L., Rosina S., De Angelis E., Quintavalla C., Bottarelli E., Borghetti P., 2009. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: clinical protection and cell-mediated immunity. Vaccine. 27, 3788-3799.

Mateu E., Martín M., Vidal D., 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. J. Gen. Virol. 84, 529-534.

Mateu E. and Diaz I., 2008. The challenge of PRRS immunology. Vet. J. 177, 345-351.

Meier W.M., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. Virology. 309, 18-31.

Mikulska-Skupien E., Szweda W., Procajlo Z., 2005. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated intradermally with deleted Aujeszky's disease vaccine and challenged with virulent strain of Herpesvirus suis type I. Pol. J. Vet. Sci. 8, 11-16.

Murtaugh M., Xiao Z., Zuckermann F., 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Viral Immunol. 15, 533-547.

Oleksiewicz M., Botner A., Madsen K.G., Storgaard T., 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. Vet. Microbiol. 64, 7-22.

Prieto C., Alvarez E., Martínez-Lobo F.J., Simarro I., Castro J.M., 2008. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. Vet. J. 175, 356-363.

Samson J.N., de Bruin T.G.M., Voermans J.J.M., Meulenberg J.J.M., Pol J.M.A., Bianchi A.T.J., 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndromevirus: a role for CD8+ cells. J. Gen. Virol. 81, 497-505.

Scheerlinck J.P. and Yen H.H., 2005. Veterinary application of cytokines. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 17-22.

Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Potapchuk D., Podgórska K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. J. Gen. Virol. 87, 1835-1841.

Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., et al., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. Arch. Virol. 153, 1479-1488.

Tamanini C., Giordano N., Chiesa F., Seren E., 1983. Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating. Acta Endocrinol. 102, 447-450.

Thacker E.L., 2005. Lung inflammatory responses. Vet. Res. 37, 469-486.

Van Gucht S., Van Reeth K., Pensaert M., 2003. Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. J. Clin. Microbiol. 41, 960-966.

Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M., 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. Vet. Microbiol. 48, 325-335.

Van Rooij E.M.A., de Bruin T.G.M., de Visser Y.E., Middel W.G.J., Boersma W.J.A., Bianchi A.T.J., 2004. Vaccine-induced T cell-mediated immunity plays a critical role in early protection against pseudorabies virus (suid herpes virus type I) infection in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 99, 113-125.

Xiao Z., Batista L., Dee S., Halbur P., Murtaugh M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. J. Virol. 78, 5923-5933.

Zhao Y.L., Murthy S.N., Manjili M.H., Guan L.J., Sen A., Hui S.W., 2006. Induction of cytotoxic T lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. Vaccine. 24, 1282-1290.

Zuckermann F.A., Garcia E.A., Luque I.D., Christopher-Hennings J., Doster A., Brito M., Osorio F., 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. Vet. Microbiol. 123, 69-85.

farmaceutici
Gellini

- Tradizione
- Esperienza
- Qualità

Farmaceutici GELLINI - Divisione di Intervet Italia
Via Fratelli Cervi snc - Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Borromini - Segrate (Milano)

HIPRA

Il **Riferimento** per la **Prevenzione** e salute della tua **Scrofaia**

www.hipra.com

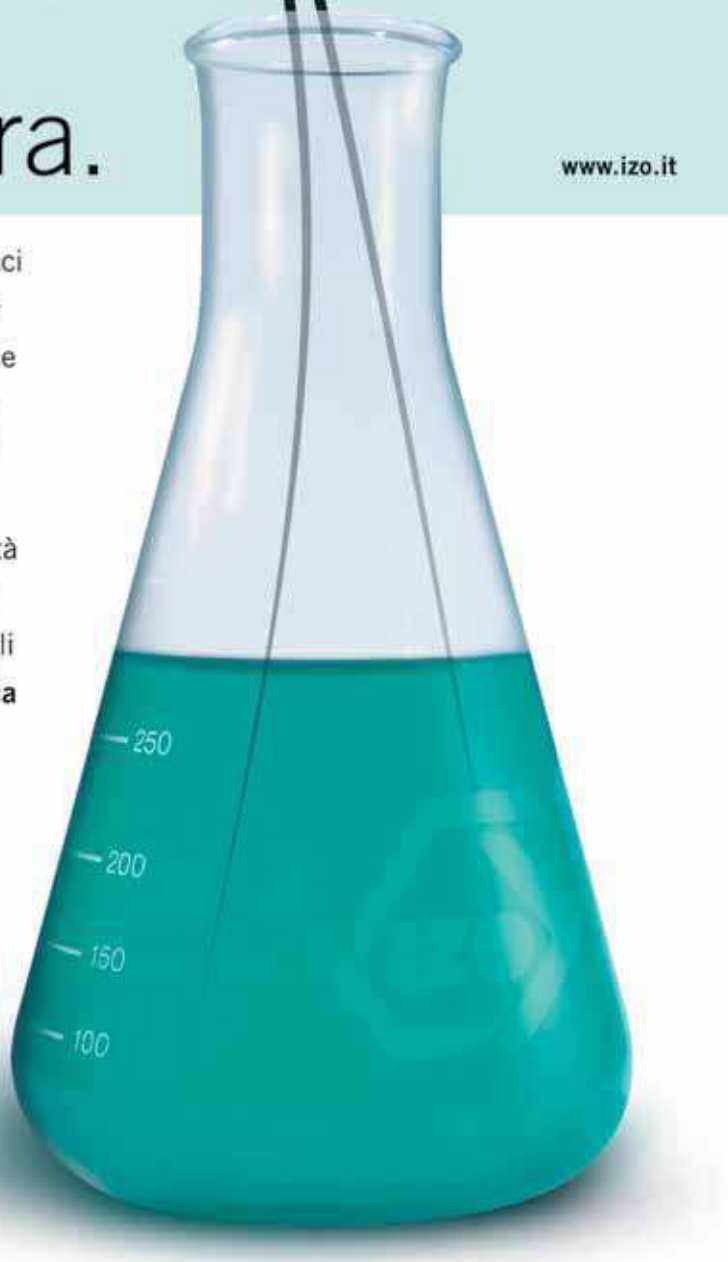
Hipra Italia, S.R.L. Via Franciacorta nº 74 · 25038 Rovato (Brescia) · Italia
Tel. (39) 030 72 43 025 · Fax (39) 030 77 00 881 · italia@hipra.com · www.hipra.com

IZO S.p.A. • Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia
Tel. 030 24 20 583 • Fax 030 24 20 550
Unità produttiva: S.S. 234 Km 28.2
27013 Chignolo Po (Pv)

Qualità rara.

www.izo.it

IZO da oltre trent'anni produce farmaci e vaccini ad uso veterinario, facendo della qualità totale e dell'innovazione tecnico-scientifica i suoi capisaldi. Nasce così una gamma di prodotti altamente affidabili in grado di garantire, insieme alla professionalità dei medici veterinari e la cura degli allevatori, il benessere assoluto degli animali da reddito. **Per IZO la ricerca della qualità è una qualità rara.**



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: merial.italia@merial.com – www.merial.com

© Copyright 2011. Tutti i diritti riservati.

MERIAL

14	1	4	9
giorni di attività nei polmoni	1 singola dose da 1 ml/10 kg p.c.	patogeni target	giorni di periodo di sospensione

IN NUMERI COME QUESTI, LA FORZA DI UN NUOVO ANTIBIOTICO LONG ACTING!

Chiedi al tuo Medico Veterinario infomazioni sul nuovo farmaco iniettabile di MSD Animal Health, per il controllo delle ricorrenti patologie respiratorie del suino.

MSD Animal Health

Intervet Italia S.r.l. - Via F.lli Cervi snc - Centro Direzionale Milano 2
Palazzo Borromini, 20090 Segrate (MI) www.msd-animal-health.it

D'ADDA, LORENZINI, VIGORELLI, BBDO

Pfizer Animal Health

P. A. N. Pattuglia Acrobatica Nazionale Frecce Tricolori (Italian Aerobatic Team)

ADV • www.creamo.it

TREI

INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI

ANIMAL HEALTH PRODUCT

> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.

dps
DryProtectionSystem

Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE
E STABILIMENTO
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT
Via Affarosa 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / *TELEPHONE:*
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

info@treivet.com
www.treivet.com

Prodotti VIRBAC

PER LA RIPRODUZIONE

Ottimizza la produttività e la resa del tuo allevamento!

VIRBAC S.r.l.
Via Caldera, 21 20153 Milano
Tel. 02.40924771 Fax 02.40924777
www.virbac.it e.mail: virbac@virbac.it

Virbac
SALUTE ANIMALE

Huvepharma is an EU producer of:

Tylosin **Tilmicosin** **Tiamulin** **Doxycycline**

Enjoy more on:
www.huvepharma.com

HUVEPHARMA®
We add performance to your business